NEMATODOS ENTOMOPARÁSITOS
Experiencias y perspectivas

PARADA S, J.C.
LUQUE Z., J.E.
PIEDRAHÍTA C, W de J.







UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ

COLCIENCIAS
COLOMBIA

Bundesministerium für
wirtschaftliche Zusammenarbeit
und Entwicklung

CIAT
Centro Internacional de Agricultura Tropical
International Center for Tropical Agriculture

Nematodos Entomoparásitos

EXPERIENCIAS Y PERSPECTIVAS

Parada S., J.C., Luque Z., J.E., Piedrahíta C, W. de J.

Editores

2006








NEMATODOS ENTOMOPARÁSITOS
Experiencias y perspectivas

Editores
Julio César Parada S.
Jesús Emilio Luque Z.
Wilson de Jesús Piedrahíta C.

Coordinación
Wilson de Jesús Piedrahíta C., Profesor Asociado, Facultad de Agronomía
Fabio R. Leiva Barón, Decano, Facultad de Agronomía

Revisión de estilo, diseño y diagramación
Clara Ximena Torres Serrano

Primera edición 2006








Impresión
Plus Line Ltda.

Publicación auspiciada por:

Colciencias-Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.
Proyecto código 1101-07-14930 - Contrato 475-2003

Proyecto Control integrado de plagas subterráneas en Suramérica.
Centro Internacional de Agricultura Tropical y Ministerio Federal para la Cooperación y Desarrollo Económico (BMZ) de Alemania.

ISBN 958-701-616-5

Catalogación en la publicación Universidad Nacional de Colombia
Nematodos entomoparásitos: experiencias y perspectivas / eds. J.C, Parada S., J.E. Luque Z., W. Piedrahita C. – Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía, 2006.
195 p. : 38 il.
ISBN : 958-701-616-5
1. Nematoda 2. Nematodos parásitos de insectos 3. Control biológico de insectos
CDD-21 592.57 / 2006

PORTADA *Nemagrafías I*
Fernando Salazar H. - Diseñador industrial, Universidad Nacional de Colombia
CONTRAPORTADA *Juntos en el tiempo* (Obra original óleo sobre lienzo)
Rubiela Martínez P. - Pintora. rmartinez70@yahoo.com

NEMATODOS ENTOMOPARÁSITOS

EXPERIENCIAS Y PERSPECTIVAS

Parada S., J.C., Luque Z., J.E., Piedrahíta C, W. de J.

Editores

2006

CONTENIDO

Participantes

Anthony C. Bellotti, Ph. D. Entomología de Yuca Centro Internacional de Agricultura Tropical Entomología de Yuca A. A. 6713, Cali-Colombia acbellotti@cgiar.org.

Ligia T. Corredor. Ingeniera Agrónoma, M. Sc., Suelos y Aguas, Asesora en desarrollo y procesos de reforestación, ltcorredorv@unal.edu.co.

Ralf-Udo Ehlers, Ph. D. Profesor Institute for Phytopathology Christian-Albrechts-University Kiel Dept. Biotechnology & Biological Control, Raisdorf, Germany ehlers@biotec.uni-kiel.de.

Andreas Gaigl, Ph. D. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Manejo de plagas subterráneas A.A. 6713, Cali-Colombia, a.gaigl@cgiar.org.

Albrecht Koppenhöfer Ph. D., Associate Professor Extension and Research Department of Entomology Rutgers University, e-mail: koppenhofer@aesop.rutgers.edu.

Maria C. Leguízamo B., Ingeniera Agrónoma, M. Sc., Suelos y Aguas, estudiante Ph. D, Escuela de posgrado U. N., sede Palmira, Valle–Colombia. mcleguizamob@unal.edu.co

Jesús Emilio Luque Z., Biólogo M. Sc., Facultad de Agronomía U. N., Bogotá D.C. luqsan@cablecentro.net.co.

Elsa L. Melo M., Asistente de Investigación Centro Internacional de Agricultura Tropical, Entomología de Yuca. A.A. 6713, Cali-Colombia, meloelsa@gmail.com.

Carlos A. Ortega O., Investigador Visitante Estudiante de Maestría Centro Internacional de Agricultura Tropical, Manejo de Plagas subterráneas, A.A. 6713, Cali-Colombia, Caoro2003@yahoo.com.

Oscar Javier Martínez P., Ingeniero Químico – Biólogo, estudiante M. Sc., Ingeniería Química Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.,U.N., sede Bogotá, ojmartinezp@unal.edu.co.

Nubia L. Palacios N., Ingeniera Agrónoma, Instructora SENA, Regional Meta, nulipan@hotmail.com.

Julio C. Parada S., Biólogo M. Sc., Entomología, estudiante Ph. D., Escuela de Postgrado, Facultad de Agronomía U. N., Bogotá D.C., insectsyco@icqmail.com.

Wilson de J. Piedrahita C., Ingeniero Agrónomo, Profesor Facultad de Agronomía, U. N., sede Bogotá, wpiedrahitac@unal.edu.co. Investigador Principal Proyecto Colciencias–Universidad Nacional de Colombia. Código 1101-07-14930 - Contrato 475-2003.

Jimena Sánchez N., Microbióloga M. Sc., Microbiología, Profesor Asistente Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, jsanchezn@unal.edu.co.

Alper Susurluk, Ph. D., Department of Nematology, Institute for Phytopathology Christian-Albrechts-University Kiel Dept. Biotechnology & Biological Control, alpersusurluk@yahoo.com.

John C. Triviño, Ingeniero Agrónomo, Consultor y asesor, desarrollo y manejo de cultivos orgánicos, jctriviño@hotmail.com.

Javier Vanegas, Biólogo, estudiante M. Sc., Microbiología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

Presentación

A lo largo de los 16 artículos que componen este libro, estudiantes, docentes e investigadores de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia (sede Bogotá, D.C.) y del Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT (Palmira) muestran experiencias y resultados logrados durante los últimos años de trabajo con nematodos entomoparásitos en Colombia.

La organización temática del texto en cada uno de los capítulos y artículos busca ilustrar al lector sobre procedimientos básicos de trabajo e investigación con nematodos entomoparásitos, en temas relacionados con el registro de especies, estudios de biología y ecología básica y evaluación de parasitismo sobre insectos de importancia económica en Colombia, como *Ancongnatha scarabaeoides*, *Anomala cincta*, *Anomala orientalis*, *Clavipalpus ursinus*, *Cyrtomenus bergi*, *Phyllophaga anxia*, *Phyllophaga fusca*, *Phyllophaga menetriesi*, *Premnotrypes vorax*, *Spodoptera* spp., y *Tecia solanivora* entre otros, que llevan a proponer pautas y procedimientos básicos para estudios de escalamiento masivo y evaluación de la eficiencia en campo, con el ánimo de motivar el interés por investigar, trabajar e integrar este interesante grupo de organismos, a programas de manejo biológico de insectos de importancia agropecuaria en Colombia.

Los artículos presentados por la Universidad Nacional de Colombia corresponden a los apartes de algunas tesis de pregrado y posgrado del grupo de trabajo en Control biológico (Facultad de Agronomía), bajo la dirección del profesor Jesús Emilio Luque Z. y el biólogo Julio Cesar Parada S., y del grupo Microorganismos del suelo, a cargo de la profesora Jimena Sánchez N. (Departamento de Biología de la sede). Dichos trabajos en la Facultad de Agronomía se han hecho merecedores a la calificación de "Tesis Meritoria".

Para el desarrollo de las investigaciones se ha contado con recursos de la Dirección Nacional de Investigaciones de la universidad Nacional de Colombia (DINAIN), del Ministerio de Agricultura (Plan de Emergencia para el control de *Tecia solanivora* a través de Fedepapa y de Cevipapa), con recursos de Colciencias dentro del marco del proyecto Colciencias-Fedepapa y particularmente del Proyecto Conciencias-Universidad Nacional de Colombia, Código 1101-07-14930; Contrato 475-2003, bajo la coordinación del profesor Wilson Piedrahita C.

La información presentada por el CIAT (Palmira), corresponde a investigaciones tendientes a la búsqueda de alternativas biológicas para el control de *Cyrtomenus*

bergi, iniciadas hacia los años 80 y aquella realizadas dentro del Proyecto de Control Integrado de Plagas Subterráneas en Sur América, con el auspicio del gobierno Alemán, bajo la dirección del doctor Anthony C. Bellotti (líder), Andreas Gaigl (jefe de proyecto) y Elsa Liliana Melo (asistente de investigación), y con la colaboración de Juan Carlos López N. (Cenicafé), Julio César Parada S.(Universidad Nacional de Colombia), Ralph-Udo Ehlers y Alper Susurluk (Instituto de Fitopatología, Departamento de Biotecnología y Control Biológico, Universidad de Kiel), y la doctora Patricia Stock (Universidad de Arizona) y Christiam Borgemeister.

Los autores del libro han socializado estos resultados en eventos nacionales e internacionales, como los congresos de la Sociedad Colombiana de Entomología (Socolen) (2000 a 2005); I y II taller "Plan estratégico para el manejo de *T. solanivora* en Colombia (1998 y 2003); seminarios internos como "Perspectivas sobre nematodos fitopatógenos y entomoparásitos en Colombia" (1997), "Segundo seminario de nematodos entomoparásitos" (1999), "Nematodos entomoparásitos una alternativa MIP" (2001), Potencial biotecnológico de microorganismos en ecosistemas naturales y agroecosistemas, (2004), I Simposio latinoamericano de hongos y nematodos entomoparásitos, en Brasil 2003 y XVI Congreso latinoamericano y XII Congreso colombiano de la ciencia del suelo (2004).

Centrando el interés en la divulgación de conocimiento sobre los nematodos entomoparásitos, y con el apoyo de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, varios de los autores han organizado dos versiones del "Curso taller sobre nematodos entomoparásitos" en los años 1999 y 2002, con la participación investigadores de Corpoica, Cenicafé, Cenipalma, Ciat y Pecet Antioquia, además de estudiantes, técnicos, productores, profesionales y especialistas de reconocidas agremiaciones y empresas privadas productoras de agroquímicos y productos biológicos en Colombia.

Nematodos entomoparásitos, Experiencias y perspectivas es entonces un selecto compilado de trabajos realizados en Colombia por investigadores de la Universidad Nacional de Colombia y del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT-Palmira), que a través de sus experiencias logran un acercamiento a la realidad de uso de estos organismos y a su vez pretenden mejorar y concretar perspectivas de uso de los nematodos entomoparásitos por parte de los productores agrícolas y pecuarios en Colombia.

Autores y editores agradecen la revisión de los manuscritos al Doctor *Daniel Uribe V.*, Profesor del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, y al Dr. *Darío Corredor P.*, del Centro de Excelencia Fitosanitaria del Instituto Colombiano Agropecuario-ICA.

Los editores

Capítulo 1

Labores de registro en Colombia

- Steinernematidae en Cundinamarca y sur de Boyacá, Colombia

- Búsqueda de nematodos entomoparásitos asociados a insectos rizófagos en regiones de Colombia y Panamá

- Aislamiento y caracterización de *Xenorhabdus bovienii*, simbionte de *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae), cepa Colombia

Steinernematidae en Cundinamarca y sur de Boyacá, Colombia[1]

Parada J. C.*

Resumen

Se reportan siete especies nativas de nematodos entomoparásitos, aisladas de suelos en áreas productoras de Papa (*Solanum* spp.), en municipios de los departamentos de Cundinamarca y sur de Boyacá, en Colombia. La extracción de los nematodos se realizó mediante el uso de insectos trampa en suelo, con larvas de *Galleria mellonella*, *Achroia grisella* y *Tecia solanivora*, así como también de insectos colectados durante los muestreos. Tras pruebas de hibridación y estudio morfométrico, se identificaron en la familia Steinernematidae las especies *Steinernema carpocapsae*, *S. cubanum*, *S. feltiae*, *S. intermedium*, *S. neocurtillae,* S. *puertoricense* y *S. riobrave*. Se hallaron parasitadas naturalmente larvas de los Lepidóptera: Gelechiidae *T. solanivora* y *Pthorimaea operculella,* y del Noctuiidae *Agrotis ipsilon*, además de *Premnotrypes vorax* (Coleoptera: Curculionidae), todos dentro de galerías en tubérculos de *Solanum phureja* y *S. tuberosum*. Cinco especies están presentes tanto en hábitat natural como cultivado, siendo únicas en hábitat cultivado *S. carpocapsae* y *S. riobrave*.

Palabras clave: nematodos entomoparásitos, *Solanum phureja, Solanum tuberosum, Steinernema, S. carpocapsae, S. cubanum, S. feltiae, S. intermedium, S. neocurtillae, S. puertoricense, S. riobrave*.

---

[1] Apartes de la tesis de M. Sc., Entomología, Escuela de Postgrado, Facultad de Agronomía, U. N., sede Bogotá.

* Biólogo M. Sc., Entomología. Estudiante Ph. D., Escuela de Postgrado, Facultad de Agronomía U. N., Bogotá, D.C. insectsyco@icqmail.com

Introducción

Los nematodos entomoparásitos son una excelente alternativa como agentes de control de insectos dañinos comúnmente reportados en suelo, por condiciones de fácil producción, aplicabilidad y adaptabilidad en campo, amplio rango y relativa muerte rápida de hospedantes (48 horas) (Stock, 1998), seguridad para el ambiente y vertebrados, acción sinérgica con otros parásitos, patógenos (Kaya y Koppenhofer, 1999) y compatibilidad con agentes químicos, junto con la buena capacidad de búsqueda de organismos blanco, incluyendo aquellos de hábitat críptico.

Tetradonematidae, Allantonematidae, Sphaeruliidae, Phaenopsitylenchidae, Mermithidae, Heterorhabditidae y Steinernematidae son algunas de las familias en que se agrupan los nematodos entomoparásitos, que presentan asociaciones con insectos como foresis, parasitismo obligado o facultativo, causando patologías en los hospedantes como esterilización, reducción de la capacidad reproductiva, de vuelo, retraso en el desarrollo y disfunciones en el comportamiento, fisiología y morfología (Stock, 1998; Kaya y Koppenhofer, 1999).

Los nematodos entomoparásitos de la familia Steinernematidae han sido satisfactoriamente aplicados en el control de insectos dañinos en Estados Unidos y la Unión Europea, destacándose *Steinernema carpocapsae* (Weisser, 1955), *S. feltiae* (Filipjev, 1934) y *S. riobravis* (Cabanillas, Poinar & Raulston, 1994) como las de mejor acción en condiciones de campo (Ehlers, 2001). En Colombia y otros países de América del Sur han sido poco explorados, debido principalmente a la falta de información acerca de la identificación y distribución de las especies nativas, base para la selección de cepas eficaces en programas de control de artrópodos y hexápodos de importancia médica, agrícola y veterinaria. El objetivo del presente estudio fue identificar las especies

nativas de nematodos entomoparásitos de la familia Steinernematidae, asociadas a insectos y presentes en suelos de esta importante zona agrícola y que podrían ser incorporadas como agentes de control biológico en cultivos de la región andina.

Materiales y métodos

Área de estudio

Se localizó entre los 2.500 y 3.610 metros de altura, en lo que corresponde a la zona de mayor producción de papa en los municipios de Zipaquirá (Zip), Villapinzón (ViP), Usme (Usm), Une (Une), Ubaté (Uba), Tausa (Tau), Subachoque (Sub), Sesquilé (Ses), Centros de investigación ICA-Soacha (SJ) y Marengo U.N. en Mosquera (Mar), Lenguazaque (Len), Guatavita (Guat), Guasca (Guas), Chocontá (Cho), Chipaque (Chi), Cogua (Cog), Carmen de Carupa (CaC) y San Bernardo-Arbeláez (Abz) en Cundinamarca y de Arcabuco (Arc), Chiquinquirá (Chi), Motavita (Mot) y Ventaquemada (Ven) en Boyacá.

Se establecieron dos altitudes por municipio: altitud 1: ±2.700 metros y altitud 2: ±3.000 metros. En cada una se seleccionaron áreas sembradas con *Solanum* spp., llamados hábitat cultivados (Hc), y áreas como franjas o parches de bosque nativo denominados hábitat naturales (Hn). Los hábitat cultivados se caracterizaron por la presencia de plantas de *Solanum phureja* o *S. tuberosum*, en periodos de desarrollo entre emergencia y cosecha. El hábitat natural se distinguió por parches de Bosque Húmedo Montano, conformados generalmente por vegetación de encenillo (*Weinmania* sp.), tunos (*Miconia* sp.) , chile (*Hypericum* sp.), pega mosco (*Befaria* sp); formaciones de pajonal-chuscal con vegetación de *Swallenochloa* sp., *Tesselata* sp., *Cortaderia* sp., *Calamagrostis* sp., *Espeletia* sp. Así mismo, formaciones de turberas con vegetación de *Cortaderia* sp., *Gregia* sp., *Sphagnum* spp., *Espeletia* spp., *Hypericum* sp., y formaciones de bosque de matorrales con *Hypericum* sp., *Ageratina* sp. y *Pentacalia* sp., entre otros.

Muestreo

Se colectaron insectos cuyos movimientos eran muy lentos, o cadáveres con coloraciones amarillo a crema oscuro, de consistencia blanda, pero no putrefacta, e inodora. Los ejemplares colectados se almacenaron y transportaron en frascos de vidrio refrigerados, con solución tipo Ringer (Stock, 1998).

Para muestras de suelo, por hábitat se siguieron dos transectos con 10 puntos de muestreo distanciados cada 10 metros, conformando cada punto de muestreo con cinco submuestras. Las submuestras fueron tomadas con pala de mano entre 25 y 35 cm de profundidad, colectando 300 g de suelo, aproximadamente, que al mezclarlo se logró una cantidad cercana a los 1.500 g de suelo por punto de muestreo. Durante cada labor de muestreo se registró pH y temperatura. Las muestras se transportaron bajo refrigeración, en bolsas plásticas marcadas con códigos de muestra, conformados por el acrónimo Mun1Hx; donde Mun = abreviatura del nombre del municipio (ej., Zip = Zipaquirá), 1= mínima altitud ó 2 = máxima altitud; Hn = hábitat natural ó Hc = hábitat cultivado.

Aislamiento de los nematodos

Los insectos infectados naturalmente por nematodos se dispusieron en cámaras de maduración y White (Stock, 1998). A medida que los JI emergieron se trasladaron a cajas plásticas con 100 g de arena de río estéril, en las cuales se expusieron larvas de los lepidópteros: Pyralidae *Galleria mellonella* y *Achroia grisella*, además de *T. solanivora*. Diariamente los montajes se observaron para identificar síntomas de parasitismo, además de disectar algunos ejemplares para verificar la presencia de nematodos. A partir del cuarto día, las larvas muertas se dispusieron en cajas de maduración y White para recuperación de JI. Las muestras de suelo fueron procesadas a través de la técnica del insecto trampa (Bedding y Arkhust, 1975). Para este propósito se liberaron 20 larvas de *G. mellonella, A. grisella* y *T. solanivora* en 100

g de suelo de los diferentes muestreos. Los montajes se dispusieron en bolsas plásticas negras y se almacenaron a 20 ^{o}C y 75% de HR. A partir del cuarto día de almacenamiento, las larvas muertas se retiraron y se dispusieron en trampas de maduración y White.

Por técnicas de cría *in vivo* (Stock, 1998) las poblaciones se incrementaron sobre larvas *G. mellonella*, a partir de JI obtenidos tanto de material biológico como del suelo. El material de juvenil infectivo (JI) se almacenó vivo en agua destilada estéril con Triton® X-100 (Bedding y Arkhust, 1975) y arena de río, dentro de cajas de Petri de 100 x 15, en concentraciones de 10^4-10^5 JI/ ml, entre 14 y 18 ^{o}C.

Los adultos y JI de la primera generación para estudio morfométrico se fijaron en TAF, en baño maría a 75 ^{o}C, y se preservaron en glicerina según el procedimiento de evaporación etanol-glicerol de Seinhorst, siendo posteriormente organizados en láminas tipo Cobb (Stock, 1998). Las espículas y los gubernaculum de los machos de la primera generación fueron extraídos, exponiendo los especímenes a ácido láctico al 45% entre 24 y 48 horas y fueron procesadas para ser analizadas bajo el microscopio.

Identificación de nematodos

Además de tener en cuenta la patología causada al hospedante, en la clasificación a nivel de orden, familia y género se usaron claves taxonómicas para adultos y juveniles infectivos, propuestas por Nguyen & Smart (1996) y Stock (1998).

Para la identificación a nivel específico, y basados en el concepto de aislamiento reproductivo, se adelantaron pruebas de retrocruce, siguiendo los procedimientos citados por Stock (1995) y Nguyen & Smart (1990). Se entrecruzaron poblaciones aisladas de los muestreos con poblaciones de *S. feltiae*, obtenidas del municipio de Villapinzón por Sáenz A., e identificado por S. P Stock en UC- Davis (Sáenz, 1998).

Durante el montaje, dos gotas de hemolinfa de *G. mellonella* se ubicaron a un centímetro de distancia sobre láminas de vidrio dentro de cajas de Petri, liberando inmediatamente en una gota 10 JI de un aislamiento y en otra 10 JI de *S. feltiae*. Todo el montaje se depositó y almacenó bajo completa oscuridad, a 20 °C, replicando cada tratamiento 15 veces. En cinco réplicas, los nematodos se observaron diariamente hasta distinguir machos y hembras, los cuales se entrecruzaron en cajas de Petri con hemolinfa y en cinco réplicas más se descartaron machos y hembras por cada población. Los nematodos fueron observados diariamente por una hora, con el fin de verificar si había cópula, postura de huevos o presencia de JI. Tanto JI de *S. feltiae* como del aislamiento en prueba fueron mantenidas en cajas separadas a manera de control. Pruebas con generaciones fértiles se consideraron como aislamientos coespecíficos, mientras que las pruebas sin generaciones fértiles se organizaron como poblaciones no coespecíficos.

En cada aislamiento coespecífico obtenido se registraron medidas en micras de JI y adultos, usando microscopio Carl Zeiss-3000 equipado con ocular micrométrico 16x, y software para captura de imágenes. Para ello se escogieron caracteres morfológicos básicamente del macho y juvenil infectivo, estructuras de valor diagnóstico en este grupo (Hominick, *et al.,* 1997), entre las que cabe citar en JI: L = largo total del cuerpo, W = ancho máximo del cuerpo, EP = distancia de la terminación más anterior al poro excretor, NR = distancia de la terminación más anterior al anillo nervioso, ES = longitud del esófago, T = largo de la cola, %A = (L/W), %B = L/ES, %C = L/T, %D = EP/ES x 100, %E = EP/T x 100. En machos: SL = longitud de la espícula de la cabeza a la punta en línea recta, SW = longitud de la espícula en la curvatura, de la cabeza a la punta: proporción (SL/SW), LG = longitud del gubernaculum, GS = LG/Lsp., MUC = presencia o ausencia de mucrón.

Por análisis de componentes principales (PCA) se examinó la agrupación general de los individuos, analizados en variables morfométricas en

machos de primera generación y juveniles infectivos. Del mismo modo, las agrupaciones discriminadas se confrontaron con material de paratipos, de la colección de nematodos del Departamento de Nematología de la Universidad de California, en Davis-CA, correspondiente a *S. neocurtillis*, (Paratype, 1 male, UCDN 5978; Paratype, 1 female, UCDN 2977), *S. oregonense* (Voucher specimens, 3 males), *S. cubanum* (Paratype, 1 male, 1 female), *S. glaseri*, *S. carpocapsae* (cepa Agriotos) y *S. riobrave* (Voucher specimens, 5 males, F1, cepa TX), e información de *S. feltiae* cepa nativa.

Resultados y discusión

La técnica de insecto cebo con *G. mellonella* y *A. grisella* mostró que del 100% de los nematodos que se asociaron a estos insectos, un 55% de la población correspondió a especies de la familia Steinernematidae y el 45% restante se ubicó dentro del orden Rhabditida, familias Rhabditonematidae y Rhabditidae, principalmente. Pruebas de retrocruce, así como los estudios morfológicos y morfométricos de los esteinernemátidos, confirmaron la presencia de las especies *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding, 1982; *S. cubanum* Mracek, Hernández & Boemare, 1994; *S. feltiae* (Filipjev, 1934) Wouts, Mracek. Gerdin & Bedding, 1982; *S. intermedium* (Poinar, 1985) Mamiya, 1988; *S. neocurtillae* Nguyen & Smart, 1992; *S. puertoricense* Roman & Figueroa, 1994 y *S. riobrave* Cabanillas, Poinar & Raulston, 1994. Durante las pruebas de retrocruce, el 63% de los montajes con aislamientos de *Steinernema* resultaron positivos para *S. feltiae* y el 37% restante discriminó las demás especies.

Con los aislamientos coespecíficos del género *Steinernema* se conformaron grupos de nematodos de acuerdo con la presencia o ausencia de mucrón en los machos. Una tabulación parcial de los PCA de especies con mucrón muestra que para los machos el PC1 explica el

69,1% de la variación, y que los tres primeros componentes explican el 92,3%. Dentro de los juveniles infectivos, los tres primeros componentes toman el 87,06% de la variación total (figura 1a). Considerando la interpretación de los dos primeros componentes para los machos (figura 1b), claramente se separan dos grupos a lo largo de PC1: todos los individuos de *S. neocurtillae* (c) y parte de *S. feltiae* (a) se localizaron en el área positiva, indicando el aporte de los caracteres positivos en este componente.

Algunos componentes de *S. feltiae* y todos los individuos de *S. carpocapsae* (b) se ubican a lo largo del área negativa, reflejo de los caracteres que menos aportan a *S. feltiae*. A lo largo de PC2 se distinguen dos grupos hacia el área negativa *S. carpocapsae* y el resto en la positiva. Observaciones similares se dan en los datos de juveniles infectivos (figura 1B), donde la longitud total (L) es el carácter

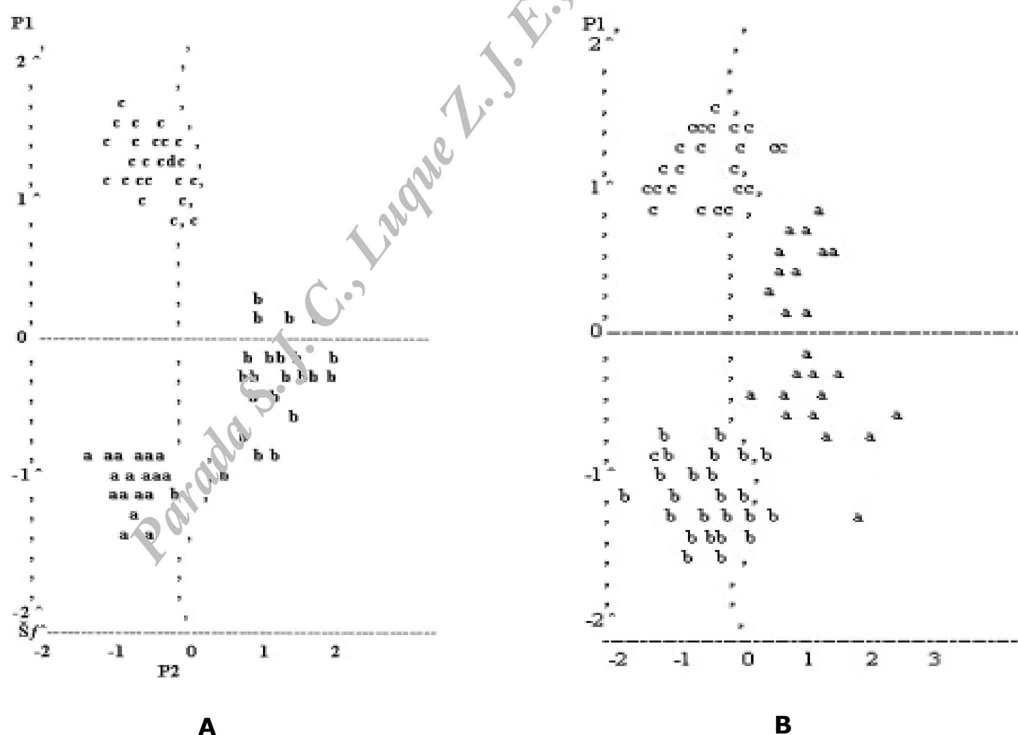


Figura 1. Análisis de componentes principales para Juveniles infectivos (A) y machos con mucrón (B) de S. carpocapsae (b), S. feltiae (a) y S. neocurtillae (c).

más influyente en PC1, a su vez la proporción (A) y el carácter (EP) en PC2 y la proporción (C) en PC3.

En las demás especies los PCA mostraron que para machos el PC1 explica el 56% de la variación y los tres primeros componentes el 90%. En los juveniles infectivos, los tres primeros componentes explican el 96% de la variación total. Los demás componentes podrían ser evaluados del mismo modo, pero el porcentaje de variación disminuye, haciendo cada vez más difícil interpretar los atributos que separan los grupos. Considerando la interpretación de los dos primeros componentes para los machos (figura 2), claramente se separan dos grupos a lo largo de PC1: todos los individuos de *S. puertoricense* (c) y *S. intermedium* (a) se localizaron en el área positiva, indicando el aporte de los caracteres positivos. Por su parte, *S. cubanum* (b) y todos los individuos de *S. riobrave* (d) se ubican a lo largo del área negativa, reflejo de los caracteres que menos aportan a *S. intermedium*.

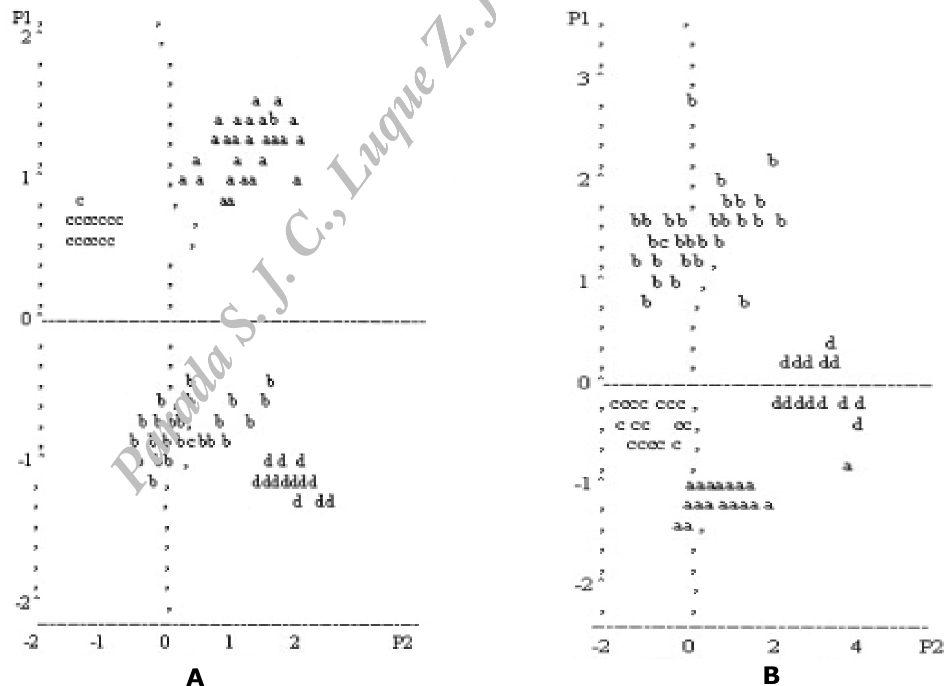


Figura 2. Análisis de componentes principales para Juveniles infectivos (A) y machos sin mucrón intermedium (a), S. puertoricense (c) y S. riobrave (d).

cubanum y el resto en la positiva. Observaciones similares se dan en los datos de juveniles infectivos (figura 2b), se distinguen dos agrupaciones básicas: *S. cubanum* (b) y parte de *S. riobrave* (d) a lo largo de PC1, mientras que en PC2 se agrupan *S. intermedium* (a), *S. riobrave* (d) y *S. puertoricense* (c) en el área más negativa.

De los 288 transectos trazados en los 24 municipios muestreados, el 56% resulta positivo para nematodos entomoparásitos, correspondientes al hábitat natural y cultivado. Se registran entre 1 y 4 especies de nematodos entomoparásitos por municipio, contando con cuatro especies en Zipaquirá y Guatavita; con tres especies Carmen de Carupa, Chocontá, Sesquilé, Subachoque, Tausa, Ubaté, Arbeláez, Arcabuco y Chiquinquirá; con dos especies Choachí, Lenguazaque, Soacha-ICA San Jorge, Une, Villapinzón, Usme y con una especie Cogua, Guasca, Mosquera-Marengo UN, Ventaquemada y Chipaque (anexos 1, 2, 3 y 4).

Cinco especies de Steinernematidae están presentes tanto en hábitat natural como cultivado, siendo únicas para el hábitat cultivado las especies *S. carpocapsae* y *S. riobrave*. Nematodos entomoparásitos se han reportado tanto en hábitat natural por Stock (1995), Hominick y Briscoe (1995) y Miduturi *et al* (1996), como en hábitat cultivado por Procter (1990), Griffin *et al*. (1991), Zdener y Coetis, (1993) y Mason *et al*. (1995). La presencia en diferentes hábitat puede ajustarse a hipótesis sobre estrategias de adaptación, como la sugerida por Jhonson (1974) quien, teniendo en cuenta procesos susecionales, argumenta que los rhabditidos pueden denominarse como estrategas tipo “r”, que pueden competir tanto en hábitat estables como disturbados, condición de paisaje común en la zona de estudio. De igual manera, la coincidencia en tiempo y espacio de hospedantes es un factor determinante para que los nematodos entomoparásitos sobrevivan en cierto hábitat, condición favorable en el área de muestreo, ya que los insectos plaga de la papa son de presencia común, aun en épocas de baja producción.

Aunque no se ha corroborado totalmente, el movimiento de nematodos entomoparásitos entre distintos hábitat puede estar influenciado por las labores de cultivo, como el transporte de semillas, las herramientas y los equipos usados para remover el suelo, y el riego, entre otros.

Dentro del área de estudio, y de acuerdo con el número de poblaciones colectadas, las especies *S. feltiae*, *S. carpocapsae*, *S. intermedium*, *S. neocurtillae* y *S. puertoricense* fueron las de más amplia distribución altitudinal, encontrándose entre los 2.496 y 3.495 metros sobre el nivel del mar. Las poblaciones de *S. cubanum* y *S. riobrave* presentan rangos de distribución angostos o puntuales. La mayoría de las poblaciones de las especies registradas en hábitat natural están presentes entre 2.900 y 3.400 metros, mientras que la mayoría de las poblaciones de especies registradas en hábitat cultivado se presentan entre los 2.500 y 2.900 metros sobre el nivel del mar. La distribución altitudinal mostrada en estas especies, en hábitat tan cercanos y de características tan particulares, posibilitaría el reconocimiento de poblaciones con tendencias de distribución simpátrica (Adams, 1998). Este concepto, junto con la riqueza de especies aquí registrada, se ajustan a ciertas hipótesis como las propuestas por Procter (1990), quien plantea que la riqueza, la diversidad trófica y de especies de nematodos tiende a ser alta a medida que se incrementa la altitud, en ecosistemas de localización intertropical, pero de igual manera serán medidos en términos de morfología, calidad, manejo y uso de suelo.

Según las características de suelo muestreado, en suelo franco arenoso se aislaron especies como *S. feltiae*, *S. carpocapsae*, *S. intermedium*, *S. riobrave*, *S. puertoricense* y *S. neocurtillae*; en suelo franco arcilloso se identificaron *S. feltiae*, *S. carpocapsae*, *S. intermedium* y *S. cubanum*; en suelo franco limoso se registraron *S. feltiae*, *S. carpocapsae*, *S. intermedium*, *S. puertoricense* y *S. neocurtillae*; en suelo franco arcillo limoso se aislaron *S. feltiae* y *S. carpocapsae*; y en suelo franco especies como *S. feltiae*, *S. carpocapsae* y *S. neocurtillae*.

Estos suelos registraron rangos de pH entre 4,1 y 6,9, pero con tendencia ácida poco neutra: 4,1-5.1, y temperatura promedio de 15 ^{o}C. La diferencia en el número de especies por textura de suelo obedece, en parte, a la disminución en el tamaño del grano, en texturas franco limosas y franco arcillo limosas que presentan poros muy pequeños, que impiden el movimiento de los nematodos, Wallace (1958) citado por Nickle (1991), condición acorde a la presentada en los suelos en el área de estudio. Sin embargo, las condiciones de temperatura y humedad presentes en suelo al momento del muestreo inciden sobre la localización de las poblaciones. De igual manera, aunque los procedimientos de recuperación de las poblaciones del suelo aseguran aproximadamente un 90% de éxito en la extracción, cabe toda posibilidad de error al dejar o eliminar poblaciones.

De los 370 insectos colectados, 274 larvas se encontraron afectadas por nematodos entomoparásitos, especialmente larvas de los ordenes Lepidóptera, Coleóptera y Díptera, que se encontraron dentro de galerías en tubérculos de *Solanum* spp. Los 96 ejemplares restantes correspondieron a insectos adultos generalmente afectados por nematodos saprófagos del genero *Rhabditis* (Rhabditida: Rhabditidae) (Cuadro 1). De las larvas correspondientes al orden Lepidóptera se identificaron 105 como polilla guatemalteca *T. solanivora*, 62 como polilla gigante de la papa *Pthorimaea operculella* (Lepidóptera: Gelechiidae) y 14 como gusano tierrero negro *Agrotis ipsilon* (Lepidóptera: Noctuiidae). De las 52 larvas identificadas en el orden Coleóptera, 24 fueron larvas de cuarto instar del gusano blanco de la papa *P. vorax* y 28 chisas *Ancongnatha scarabaeoides* (Coleóptera: Melolonthidae). En el orden Díptera se identificaron 23 larvas como *Liriomyza braziliensis* (Díptera: Agromyzidae) y 18 larvas de quinto instar de *Simulium simulium* (Díptera: Simulidae).

S. feltiae fue la especie que presentó el mayor número de especímenes recuperados de insectos en campo, principalmente en hábitat cultivado,

Tabla 1. Especies de *Steinernema* aisladas de insectos colectados en campo. En paréntesis ( ) número de larvas parasitadas. S. = *Steinernema*

Insectos	Código de muestra/ (No) larvas parasitadas	Especies
Tecia solanivora	Vip1HcHp (40)	*S. feltiae*
	Mot2HcHp (5)	*S. feltiae*
	Cog1HcHp (23)	*S. feltiae*
	SJ1Hn (12)	*S. feltiae*
Pthorimaea operculella	Zip1HcHp (15)	*S. carpocapsae*
	Mar1HcHp (10)	*S. carpocapsae*
	Uba2HcHp (27)	*S. feltiae*
	Zip1HcHp (32)	*S. feltiae*
Agrotis ipsilon	Len1HcHp (3)	*S. carpocapsae*
	Mar1HcHp (9)	*S. carpocapsae*
Premnotrypes vorax	Mot2HcHp (11)	*S. feltiae*
	Ven2HcHp (9)	*S. feltiae*
Ancongnatha scarabaeoides	Sub1HcHp (4)	*S. feltiae*
	Sub1HcHp (5)	*S. carpocapsae*
Liriomyza brasiliensis *Simulium simulium*	Cho1HcHp (23)	*S. feltiae*
	Cog1HcHp (18)	
	Turberas Páramo Cruz verde 3481 m.s.n.m. (19)	

al encontrarse en 80 larvas de *T. solanivora*, 59 de *P. operculella*,18 de *L. brasiliensis* y 24 de *P. vorax*, todos reportados como insectos de importancia agrícola para el cultivo (Landazábal *et al*, 1973; Rodríguez, 1986 Garzón y Aza, 1994); sólo 12 larvas de *T. solanivora* se colectaron en el hábitat natural del centro experimental San Jorge-ICA, en Soacha, Cundinamarca (SJ1Hn). Por su parte, *S. carpocapsae* se encontró en 25 larvas de *T. solanivora*, 3 de *P. operculella*, 9 de *A. ipsilon* y 5 de *A. scarabaeoides*.

De las especies de insectos reportados en Colombia como hospedantes naturales de nematodos entomoparásitos, sólo *P. vorax* ha sido reportada para nematodos del género *Steinernema* sp., (Parada, *et al*, 1998) en áreas cultivadas con *Solanum* sp., en el municipio del Rosal, Cundinamarca; especies de chisas del género *Phyllophaga* (Melolonthidae) han sido reportadas en el oriente antioqueño, afectadas con nematodos de la especie *S. carpocapsae* (Londoño, 1999). Las

otras especies se constituyen como primeros reportes de hospedantes naturales para el país, junto con las especies de nematodos entomoparásitos que los afectan.

El mayor número de aislamientos de nematodos entomoparásitos corresponde a estados larvales de insectos y no a los adultos, posiblemente por las condiciones de hábitat críptico que ocupan las larvas de insectos de estas especies bajo condiciones naturales; esto favorece la supervivencia de los nematodos y su parasitismo, pues las condiciones de baja humedad, altas temperaturas y aumento de radiación ultravioleta a la que están expuestos los insectos adultos son detrimentales para los nematodos entomoparásitos (Kaya y Koppenhafer, 1999).

El hallazgo de nematodos entomoparásitos afectando insectos en campo, no sólo da razón de las poblaciones de nematodos entomoparásitos presentes en suelo, sino de su alta capacidad de búsqueda sobre insectos con comportamientos de hábitat ocultos o crípticos, como las larvas de *T. solanivora* y *P. vorax*, las cuales construyen galerías en los tubérculos de *Solanum* spp, obstáculos contra el ataque de patógenos y depredadores. Pero a su vez, la humedad en las galerías y las "huellas" dejadas por sus deyecciones, son las señales para ser detectadas por los juveniles infectivos de nematodos entomoparásitos (Stock, 1998).

Es conveniente enfocar tareas de registro biológico en áreas de importancia agrícola en el país, no sólo para aportar listas de especies, sino también para lograr determinar hospedantes naturales en condiciones de hábitat y ecosistemas particulares, como los del bosque alto andino y el páramo, correspondientes al área de estudio.

Las especies registradas posiblemente darán buenos resultados en programas de manejo biológico de plagas en cultivos del área andina,

debido a que su permanencia en suelos bajo condiciones de cultivo muestran su adaptabilidad a condiciones de manejos productivos agrícolas, tan intensivos como los cultivos de papa.

REFERENCIAS

ADAMS, B.J. 1998. Species Concepts and the Evolutionary Paradigm in Modern Nematology. Journal of Nematology 30: 1-21.

BEDDING, R.A.; AKHURST, R.J. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic Rhabditid nematodes in soil. Nematologica 21, 109-110.

EHLERS, R.U. 2001. Mass production entomopathogenic nematodes for plant protection. Applied Microbiolgy Biotechnology 56:623-633.

GARZÓN, M.; AZA, B. 1994. Potencial del nematodo *Steinernema* sp. para el control biológico del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* (Hust). Fac. de Agro., U. N., Tesis de I. A., Santafe de Bogotá, D.C.

GRIFFIN, C.T.; JOYCE, S.A.; DIX, I.; BURNELL A.M. & DOWNES, M.J. 1991. Characterization of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis* (Nematoda: Heterorhabditidae) from Ireland and Britain by molecular and cross-breeding tecniques, and the occurrence of the genus in these islands. Fund. Appl. Nematol. 17. 245-253.

HOMINICK, W.M.; REID, A.P. and BRISCOE. 1995. Prevalence and habitat specificity of steinernematid and hetrorhabditid nematodes isolated during soil surveys of UK and the Netherlands. Journal of Helminthology 69: 27-32.

HOMINICK, W.M., *et al*. 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: current status, protocols and definitions. Journal of Helminthology 71:271-298.

KAYA, H.K.; KOPPENHOFER, A.M. 1999. Biology and Ecology of Insecticidal Nematodes. En Optimal use of insecticidal nematodes in pest management. Ed. S. Polavarapu, pp 1-8, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA.

LANDAZABAL, J.; FERNÁNDEZ, F. y FIGUEROA, A. 1973. Control biológico de *Agrotis ipsilon* (J.E. Smith) con el nematodo *Neoaplectana carpocapsae* en maíz (*Zea mays*). Acta Agronómica, 23: 41-70.

LONDOÑO, M. 1999. Efecto de *Steinernema carpocapsae* sobre especies de chiza en Colombia. En: II Seminario sobre Nematodos Entomopatógenos, Facultad de Agronomía. U.N. Bogotá, pp. 54-65.

MIDUTURI, J.S., *et al*. 1996. Naturally ocurring entomopathogenic nematodes in the province of West-Flanders, Belgium. Journal of Helminthology 70: 319-327.

MASON, J.M.; ALBERT, C. and BERNF, R. 1995. The recovery of entomopathogenic nematodes from selected areas within Peninsular Malaysia. Journal of Helminthology 70: 303-307.

NGUYEN, K.B. y SMART, G.C. Jr. 1990. *Steinernema scapterisci* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae). Journal of Nematology 22(2): 187-199.

NGUYEN, K.B. y SMART, G.C. Jr. 1996. Identification of Entomopathogenic Nematodes in the Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nemata: Rhabditida). J. of Nematol. 28(3): 286-300.

NICKLE, W.R. 1991. Manual of agricultural nematology. Marcel Dekker, New York.

PARADA, J.C.; SÁENZ, A. y LUQUE, E. 1998. Uso de *Steinernema feltia* sobre *Tecia solanivora* EN: Conclusiones y memorias del taller "Planeación estratégica para el manejo de *Tecia solanivora* en Colombia", Santafe de Bogotá, D.C., julio de 1998.

PROCTER, D.L. 1990. Global overview of the functional roles of soil-living nematodes in terrestrial comunities and ecosystems. Journal of Nematology 22 (1): 1-7.

RODRÍGUEZ S., D.A. 1986. Entomopatógenos registrados en gusano blanco y pruebas de patogenicidad. Memorias del curso sobre control integrado de plagas de papa. CIP-ICA.

SÁENZ, A. 1998. *Steinernema feltiae* FILIPJEV, 1934, Cepa Villapinzón (Rhabditida: Steinernematidae). Ciclo de Vida, Patogenicidad y Métodos de Cría. Tesis M. Sc., Facultad de Agronomía, U.N. de Colombia, Bogotá, D.C.

STOCK, S.P. 1995. Natural populations of entomopathogenic nematodes in the pampean region of Argentina. Nematropica 25: 143-148.

STOCK, S.P. 1998. Sistemática y biología de nematodos parásitos y asociados a insectos de importancia económica, Universidad Nacional de Litoral, Esperanza, Santafe, Argentina, Octubre 1998, p. 99.

ZDENEK and COETIS, D. 1993. Recovery entomopathogenic nematodes in Caribbean Island. J. of Biotech.14: 45-52.

Anexo 1. Distribución geográfica de *S. feltiae*



Anexo 2. Distribución geográfica de *S. intermedium* y *S. puertoricense**



Anexo 3. Distribución geográfica de *S. carpocapsae* y *S. cubanum**



Anexo 4. Distribución geográfica de *S. neocurtillae* y *S. riobrave**



Búsqueda de nematodos entomoparásitos asociados a insectos rizófagos en regiones de Colombia y Panamá

Elsa Liliana Melo M.*, Carlos Alberto Ortega O.**, Alper Susurluk***, Andreas Gaigl**, Ralf-Udo Ehlers***

Resumen

En la búsqueda de enemigos naturales para el control de plagas subterráneas como chisas y chinche de la viruela, se realizaron muestreos en diferentes regiones de Colombia y Panamá. Fueron evaluadas 320 muestras usando larvas del insecto trampa *Galleria mellonella*. La especie *Steinernema kraussei*, identificada usando la técnica molecular PCR, se reportó por primera vez en el país; ésta fue encontrada en dos sitios, en Montelindo (Risaralda) y Santander de Quilichao (Cauca), encontrándose asociada a *Inga* sp. y *Manihot esculenta,* respectivamente.

Introducción

Desde la década del 90, el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) ha investigado la presencia de los entomonematodos en Colombia y su asociación natural con insectos plaga.

Extensas zonas cultivadas de Colombia están afectadas por plagas subterráneas, entre las que se destacan el chinche *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae) y un complejo de especies de chisas (Coleoptera: Melolonthidae) de los géneros *Phyllophaga, Anomala* y *Cyclocephala*, entre otras. Estas plagas polífagas y rizófagas se

* Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. A. A. 6713, Cali. Tel.: 445 00 00, fax.: 445 00 73, meloelsa@gmail.com

** Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT.

*** Ph.D. Instituto de Fitopatología, Departamento de Biotecnología y Control Biológico, Universidad de Kiel, Klausdorfer Straße 28-26, 24223 Raisdorf, Alemania.

encuentran en diversidad de ambientes, ocasionando graves pérdidas de rendimiento.

El empleo del control químico ha sido la alternativa para proteger los cultivos, pero sin resultados satisfactorios y a muy alto costo económico y ambiental. Buscando métodos de control alternativos, el uso de agentes microbiológicos, particularmente de nematodos entomopatógenos (nep's), representa una opción promisoria.

En busca de estos organismos se han realizado capturas de poblaciones nativas y estudios de distribución a través del mundo, encontrándose en variedad de hospederos como pastos, especies forestales, hortalizas, frutales, flores, etc., los cuales presentan diferentes características de suelos (Rueda *et al*, 1993).

Caicedo y Bellotti (1996) realizaron un reconocimiento de nematodos nativos asociados a *C. bergi* en ocho localidades de Colombia (Santágueda, Caldas, 1992; La Florida, Risaralda, 1992; Santander de Quilichao y Cauca, 1992) asociados a cultivos de yuca, maní y cebolla junca. Se recuperaron tres cepas de la especie nativa identificada por G. Poinar como *Heterorhabditis bacteriophora* (SQCP2, LFR92 Y SC92); además de esto, se reportó una nueva especie *Rhabditis colombiana* n. sp. Stock, la cual se encontró en muestras de suelo del departamento del Cauca (Stock *et al*, 2005; Caicedo, 1993).

Metodología

Sitios muestreados

Desde comienzos del año 2000 se han realizado colecciones de suelo de diferentes regiones de Colombia (Caldas, Cauca, Quindío y Risaralda) y Panamá (El Valle de Antón, Ocú, Sioguí, Cerro Punta); éstas fueron hechas en sitios donde habían reportes de plagas subterráneas como *C. bergi* y los complejos de chisas (Coleoptera: Melolonthidae).

Captura de nematodos

Para la captura de los entomonematodos se utilizaron individuos inmaduros del insecto trampa *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), los cuales presentan más susceptibilidad ante estos patógenos que los insectos hospederos comunes. *G. mellonella* provee una excelente detección de nematodos tanto *in situ* como en laboratorio para muestras procesadas (Bedding y Akhurst, 1975).

Toma de muestras de suelo para extracción de nep's

El muestreo se hizo al azar en cada lote, a una profundidad entre 15 a 20 cm, tomando 10 muestras compuestas de 3 submuestras (1.000 cm^3) en cada sitio, y manteniéndolas en una termonevera con hielo, aproximadamente entre 8-15 °C, hasta llevarlas a laboratorio. Para esta actividad se utilizó un barreno de 4,5 cm de diámetro, al que se desinfectó con alcohol y agua entre lote y lote.

Muestras de suelo para el análisis fisicoquímico

Se tomaron 500 g de suelo por sitio para determinar la composición físicoquímica de cada muestra en la unidad de análisis de suelos del CIAT.

Búsqueda, reactivación y almacenamiento de nep's en laboratorio

Cuando las muestras llegaron al laboratorio se almacenaron en completa oscuridad, a 15 °C, para su procesamiento. Se depositaron 300 g de suelo en vasos plásticos con 10 larvas de *G. mellonella*, las cuales se extraían luego de cinco días para posteriormente ser llevadas a cajas de petri con papel filtro humedecido (pequeña trampa *White*). Este procedimiento se repitió por tres veces, depositando cada vez nuevas larvas del insecto trampa en el mismo suelo. Los nematodos que salieron de las larvas y migraron al agua circundante de la trampa *White* se lavaron con formaldehído al 0,5% y se mantuvieron en tubos de ensayo. Los nematodos así obtenidos se dispusieron en cajas de petri con arena,

donde se introdujeron larvas de *G. mellonella* para verificar la reinfección (Postulados de Koch); este procedimiento se repitió dos veces para, finalmente, almacenar los entomopatógenos extraídos de estas larvas en agua destilada estéril (ADE).

Resultados

En estas exploraciones se obtuvieron 320 muestras (300 g c/u) de 15 cultivos en 23 sitios, resultando el 70% positivas para nematodos, aproximadamente; se encontraron nematodos diferentes en las muestras de un mismo sitio. Los nematodos con comportamiento y características morfológicas de parásitos se enviaron a expertos en Alemania para su identificación. De 20 muestras aparentemente positivas para nep's, usando la técnica molecular de PCR, dos lograron ser identificadas como *Steinernema kraussei* Steiner (Rhabditida: Steinernematidae); ambas procedentes de Risaralda-Montelindo (en *Inga* spp.) y Cauca-Santander de Quilichao (en *Manihot esculenta* L.), siendo el primer reporte de esta especie para Colombia (Melo *et al*, 2004). Los suelos de estas muestras presentaron, respectivamente, como características fisicoquímicas un pH de 5,8 y 6,4; materia orgánica 56,3 y 44,9, y textura franco arcillo-arenosa y franco arcillosa.

Posterior a este registro, entre septiembre y diciembre del 2002 se realizaron otras exploraciones en tres localidades que incluían los departamentos de Risaralda (Pereira), Caldas (Manizales) y Cauca (Santander de Quilichao); allí se colectaron insectos vivos y muertos. Se procesaron 193 muestras, encontrándose nep's sólo en diez. Se aisló una cepa de *Heterorhabditis* proveniente de muestras de Pereira (La Colonia), la cual está en proceso de identificación por parte de P. Stock en la Universidad de Arizona (Caicedo *et al*, 2004).

Los resultados obtenidos hasta el momento muestran la diversidad de cepas que se encuentran en Colombia y su potencial como controladores de plagas subterráneas; aún queda mucho por investigar en esta área,

con el fin de utilizar estos entomoparásitos dentro de programas de control biológico aplicables en el país.

Referencias

BEDDING, R.A.; AKHURST, R.J. 1975. A simple technique for the detection of insect rhabditid nematodes in soil. Nematologica 21: 109-110.

CAICEDO, A.M.; TRUJILLO, H.E.; QUINTERO, M.P.; CALATAYUD, P.; BELLOTTI, A. C. 2004. Reconocimiento de nematodos entomopatógenos asociados al chinche subterráneo de la viruela *Cyrtomenus bergi* (Hemiptera: Cydnidae) en tres localidades de Colombia. Resumen. XXXI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. p. 138. Bogotá.

CAICEDO, A.M.; BELLOTTI, A.C. 1996. Reconocimiento de nematodos entomopatógenos nativos asociados con *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae) en ocho localidades de Colombia. Revista Colombiana de Entomología, 22: 19-24.

CAICEDO A.M. 1993. Evaluación del parasitismo del nematodo entomógeno *Steinernema carpocapsae* Weiser (Rhabditidae: Steinernematidae) y reconocimiento de nematodos nativos asociados a *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae). Trabajo de grado de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Palmira. 101 p.

MELO, E.L.; ORTEGA, C.A.; SUSURLUK, A.; GAIGL, A.; EHLERS, R-U.; BELLOTTI, A.C. 2004. Búsqueda de poblaciones nativas de nematodos entomopatógenos en regiones de Colombia y Panamá. Resumen. XXXI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. p. 139. Bogotá.

RUEDA, L.M.S.; OSAWARU, L.; GEORGI; R.E. HARRINSON. 1993. Natural Occurrence of Entomogenous Nematodes in Tennessee Nursery Solis. Journal of Nematology 25 (2): 181-188.

STOCK, S.P.; CAICEDO, A.M.; CALATAYUD, P.A. 2005. *Rhabditis* (*Oscheius*) *colombiana* n. sp. (Nematoda: Rhabdtidae) a necromenic associate of the subterranean burrower bug *Cyrtomenus bergi* (Hemiptera: Cydnidae) from the Cauca Valley, Colombia. Nematology 7(3): 363-373.

Aislamiento y caracterización de *Xenorhabdus bovienii*, simbionte de *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae), cepa Colombia

Triviño. J.[*], Vanegas, J.[**], Martínez J.[**],
Sánchez, J.[***], y Parada J.C.[****]

Resumen

Xenorhabdus bovienii es una bacteria simbionte del nematodo *Steinernema feltiae*, cuya acción letal permite el control de insectos plaga. Su aislamiento se efectuó mediante siembra en superficie en el medio NBTA de hemolinfa de cadáveres de larvas de *Galleria mellonella* infectados con nematodos de *S. feltiae* y se emplearon pruebas bioquímicas de utilización de sustratos para su caracterización. La cepa aislada presentó dos variaciones de fase, detectadas por cambios de coloración de las colonias durante 24-48 horas de crecimiento en medio NBTA. Las pruebas de patogenicidad de la cepa de *X. bovienii* contra *G. mellonella* registraron una mortalidad del 70%. La actividad antibiótica de *X. bovienii* para el control de *Bacillus cereus* se evidenció mediante la observación de zonas de inhibición.

Palabras clave: aislamiento, *Xenorhabdus bovienii, Steinernema feltiae,* nematodos.

Introducción

Xenorhabdus bovienii como simbionte de *Steinernema feltiae*, al igual que las demás especies de bacterias asociadas a nematodos de la familia Steinernematidae, garantiza su acción letal en el insecto

* Ingeniero Agrónomo, consultor y asesor. Área agrícola.
** Biólogos, U. N., sede Bogota, ojmartinezp@unal.edu.co
*** jsanchezn@unal.edu.co
**** insectsyco@icqmail.com

hospedante, siempre y cuando el juvenil infectivo (JI), deprima la actividad inmunológica del hospedante y éste, a su vez, sea una excelente fuente de nutrientes que permita su acción antibiótica, rápida proliferación y garantice que sea monoxénico, para un buen desarrollo y proliferación del nematodo (Boemare y Akhurst, 1988; Elhers *et al,* 1990; Lunau *et al,* 1993; Chavarria y De la Torre, 2001).

Se han registrado variaciones de fase para la bacteria simbionte, observando que la fase primaria aislada del JI o de cadáveres infectados es de gran importancia en el proceso patogénico y requiere factores específicos para su multiplicación (Ehlers, 2001). La fase dos se observa con claridad cuando los nematodos abandonan el cadáver, así como en cultivo *in vitro*; no obstante, la bacteria en esta fase pierde varias funciones metabólicas y los mecanismos que causan la variación de fase aún no son claros (Boemare y Akhurst, 1987).

La producción comercial de nematodos para el control de plagas implica establecer las condiciones del medio de cultivo que garanticen la adaptabilidad del complejo bacteria-nematodo. Medios complejos ricos en peptonas, lípidos, extracto de levadura y carne han resultado favorables para el mantenimiento y proliferación tanto de la bacteria como del nematodo (House *et al,* 1965; Sicard, *et al,* 2003). Sin embargo, este proceso varía de acuerdo con los componentes del medio y la tasa de transformación de la bacteria, del nematodo y del complejo bacteria-nematodo (Chavarria y De la Torre, 2001).

El objetivo del presente estudio fue el aislamiento y caracterización de la cepa de *X. bovienni* presente en el nematodo *S. feltiae* cepa Colombia, lo que constituye una etapa inicial en el proceso de determinación de la cinética poblacional en medios de cultivo, valoración de un método por colorimetría para la detección del cambio de fase en la bacteria y el establecimiento de su actividad antibiótica.

Aislamiento de *X. bovienni* a partir de hemolinfa

La bacteria simbionte se obtuvo aislándola de la hemolinfa de larvas de *G. mellonella* de último instar infectadas con *S. feltiae,* según la metodología descrita por Akhurst y Boemare (1990). Los aislamientos se caracterizaron en medio NBTA (Agar nutritivo + 0,0025% azul de bromotimol + 0,004% de cloruro de trifeniltetrazolio) y en agar McConkey (Woodring y Kaya, 1988), medios que permitieron evidenciar las dos formas de la bacteria asociada.

Caracterización de *X. bovienii*

Se usó como criterio de selección de la bacteria la asimilación del azul de bromotimol, luego de 42 horas de incubación. Una vez obtenidos los aislamientos, se llevaron a cabo la descripción macroscópica de las colonias, la tinción de Gram y las pruebas bioquímicas de utilización de sustratos, empleando paneles comerciales de identificación BBL Crystal® y pruebas complementarias a éste. Como pruebas confirmatorias, se realizaron pruebas de patogenicidad para larvas de *G. mellonella*.

El cultivo base se inició transfiriendo una de las colonias previamente aisladas a un medio líquido YS (0,5 g K_2HPO_4, 0,5g $NH_4H_2PO_4$, 0,2g $MgSO_4*7H_2O$, 5,0g NaCl, 5,0g extracto de levadura, 1l agua destilada estéril), incubando a 25 °C durante dos días, en agitación a 200 rpm. Las bacterias en fase I y fase II fueron almacenadas en medio con glicerol al 15%, en Eppendorf® a -80 °C.

Propiedades entomotóxicas

Actividad antibiótica. Se evaluó la actividad antimicrobiana de *X. bovienii* en fase I sobre *Bacillus cereus,* según el método de difusión en agar (Madigan *et al,* 1999). Ésta consistió en inocular una placa con *B. cereus* con 24 horas de crecimiento en medio nutritivo, distribuyéndolo uniformemente por la superficie del agar. Después se

pusieron sobre la placa discos de papel filtro impregnados con *X. bovienii* de 24 horas de crecimiento en medio nutritivo, registrando el tamaño de las zonas de inhibición a las 24 horas.

Patogenicidad. Se prepararon soluciones (10 ml) de buffer fosfato (50 mM) conteniendo, respectivamente, 90.000.000, 900.000, 90.000, 9.000, 900 y 90 células/ml, las cuales fueron inyectadas vía oral con ayuda de una jeringa Hamilton de 10 µl, en el hemocele de larvas de últimos instares de *G. mellonella*. Cabe anotar que las larvas fueron previamente desinfectadas superficialmente con alcohol al 70% por 5 minutos y lavadas con agua destilada estéril. Las larvas se dispusieron en cajas de petri con papel filtro estéril y se incubaron a 21 °C en oscuridad, registrando mortalidad del insecto y cambio en la coloración de la cutícula durante 24-72 horas. El montaje se replicó con 25 larvas por dosis. Se inocularon larvas con solución salina como tratamiento control.

Resultados y discusión

Aislamiento y caracterización de *X. bovienii*

En los ensayos previos de desinfección superficial de nematodos JI se observó que dicho procedimiento generaba problemas de contaminación que dificultaron la obtención de *X bovienii.* En contraste, la técnica de aislamiento a partir de hemolinfa de cadáveres de *G. mellonella* infectados con nematodos de *S. bovienii* permitió el aislamiento de *X. bovienii* en agar NBTA.

Las colonias en FI se observaron circulares, convexas, granuladas, opacas, con borde irregular, mientras que en FII se presentaron planas, translúcidas, con margen regular y de un mayor diámetro que las FI. En agar McConkey las colonias FI tomaron coloración entre rojo y rosado mientras que en FII se tornaron blancas o amarillas. En agar NBTA las colonias FI se tornaron azul-verde, con una zona clara alrededor de la

colonia, mientras que en FII se tornaron rojas y casi marrón, sin una zona clara alrededor.

En la tabla 1 se registran los resultados de las pruebas bioquímicas empleando paneles BBL Crystal®. Éstos coinciden en más de un 50% con los reportados por Boemare y Akhurst (1987), considerados como relevantes para la identificación de *Xenorhabdus bovienii*. Sin embargo, las diferencias encontradas para las pruebas de arabinosa, urea, arginina, lisina, glucosa, rojo de metilo, indol, movilidad, nitratos y oxidasa pueden corresponder a características de la cepa, lo que es muy común en especies de estos géneros de bacterias simbiontes de nematodos entomopatógenos.

Igualmente, las pruebas confirmatorias utilizadas tales como patogenicidad para larvas de insectos, adsorción de azul de bromotimol y reducción del cloruro de trifenil tetrazolio en fase II, definen esta especie y son las más recomendadas como fiables (Boemare y Akhurst, 1987).

Propiedades entomotóxicas

Actividad antibiótica. Se presentaron zonas de inhibición de crecimiento con áreas promedio de 0,43 cm^2 de la cepa *Bacillus cereus* por actividad antibiótica de *X. bovienii*. Los tratamientos control no presentaron inhibición del crecimiento de *B. cereus*. El promedio en actividad de inhibición de la cepa en estudio se ajusta a valores promedios reportados para cepas de especies distribuidas en zonas tropicales y templadas de Europa y Estados Unidos (Boemare y Akhurts, 1998; Lunau *et al,* 1993).

La actividad antibiótica del simbionte refleja la capacidad infectiva contra posibles invasores secundarios como hongos, otras bacterias y eventuales carroñeros presentes en el ambiente, además de asegurar un ambiente adecuado para el desarrollo y actividad del nematodo

Tabla 1. Relación de las pruebas bioquímicas efectuadas para la identificación de *X. bovienii* comparadas con lo reportado para dicho género.

N.	Bioquímicas	Aislamiento	Literatura*
1	Arabinosa	+	-
2	Manosa	+	+
3	Sacarosa	-	-
4	Melibiosa	-	-
5	Ramnosa	-	-
6	Sorbitol	-	-
7	Manitol	-	-
8	Adonitol	-	-
9	Galactosa	-	-
10	Inositol	-	-
11	p-n-p-fosfato	+	+
12	p-n-p-a--glucósido	+	+
13	p-n-p--galactósido	+	+
14	Prolina nitroanilida	-	-
15	p-n-p bis fosfato	+	+
16	p-n-p- xilósido	+	+
17	p-n-p-a-arabinósido.	[illegible]	+
18	p-n-p-fosforilcolina	+	+
19	p-n-p-a- glucorónido	-	-
20	p-n-p-N-acetil glucosamidina	+	+
21	-L-glutamil p-nitroanilida	+	+
22	Esculina	+	+
23	p-nitro-DL-fenilalanina	-	-
24	Urea	+	-
25	Glicina	+	+
26	Citrato	-	-
27	Ácido malónico	-	-
28	Cloruro de trifenil tetrazolio	D	D
29	Arginina	+	-
30	Lisina	-	+
	Bioquímicas complementarias		
1	Lactosa	-	-
2	Sacarosa	-	
3	Glucosa	-	+
4	Producción de gas	-	-
5	Rojo de metilo	+	-
6	Voges Proskauer	-	-
7	Sulfuros	-	-
8	Indol	D	+
9	Movilidad	-	+
10	Nitratos	+	-
11	Gelatina	-	
12	Catalasa	-	-
13	Oxidasa	+	-
14	Patogenicidad en larvas	+	+
15	Adsorción azul de bromotimol	+	+
15	Colonia en Agar MacConkey	Roja	Marrón

D: resultado dudoso en donde no se puede afirmar si es positivo o negativo para esa prueba.
* Boemare y Akhurst, 1988.

dentro del hospedante (Ehlers *et al,* 1990; Sicard *et al,* 2003); lo anterior sugiere que el simbionte presenta buena actividad antibiótica y patogénica sobre larvas del lepidóptero.

Patogenicidad. Trascurridas 24 horas se registró un 70% de mortalidad para larvas de *G. mellonella*. A partir de la extracción de hemolinfa de los cadáveres, se obtuvieron cultivos puros de *X. bovienii*. Este ensayo corroboró la pureza inicial del aislamiento y la rápida actividad patogénica del simbionte sobre el hospedante, con respecto a la patogenicidad observada en cepas simbiontes de *S. feltiae* de aislamientos no neotropicales, que bajo condiciones similares (Dunphy y Webster, 1989; Shapiro y Gaugler, 2002) presentaron actividad y muerte de larvas entre las 24 y 48 horas.

Referencias

AKHURST, R.J.; BOEMARE, N.E. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus* spp., In: R. Gaugler and H. Kaya (ed.), Entomopathogenic nematodes in biological control CRC Press, Boca Raton, Fla. Pp. 75-90.

BOEMARE, N.E.; AKHURST, R.J. 1987. Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). J. Gen. Microbiol. 134: 1835-1845.

BOEMARE, N.E. AKHURST R., 1988. Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae) Journal of General Microbiology 134: 751-761.

CHAVARRIA-HERNÁNDEZ, N.; DE LA TORRE M. 2001. Population growth kinetics of the nematodo, *Steinernema feltiae*, in submerged monoxenic cultures. Biotechnol Lett 23: 311-315.

DUNPHY, G.B.; WEBSTER, J.M. 1989. The monoxenic culture of *Neoaplectana carpocapsae* DD-136 and *Heterorhabditis heliothidis*. Revue Nematologie 12: 113-123.

EHLERS, R.; STOESEL, S.; WYSS, U. 1990. The influence of phase variants of *Xenorhabdus* spp., and *Escherichia coli* (Enterobacteriaceae) on the propagation of entomopathogenic nematodes of the genus *Steinernema* and *Heterorhabditis*. Rev. Nematol. 13: 417-424.

EHLERS, R.U. 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. Appl Microbiol Biotechnol 56:623-633.

HOUSE, H.L.; WELCH, H.E.; CLEUGH, T.R. 1965. Food medium of prepared dog biscuit for the mass-production of the nematode DD-136 (Nematyoda: Steinernematidae), Nature 206:84.

LUNAU, S.; STOESSEL, A.; SCHMIDT, P.; EHLERS, R. 1993. Establischment of monoxenic inocula for scaling up in vitro cultures of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp., and *Heterorhabditis* spp. Nematologica 39:385-399.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. 1999. Brock, biología de microorganismos. Octava edición. Prentice Hall Iberia, Madrid.

SHAPIRO, I.D.; GAUGLER, R. 2002. Production technology for entomopathogenic nematodes and their bactyerial symbionts, Journal of Industrial & Biotechnology, 28:137-146.

SICARD, M.; LE BRUN, N.; PAGES, S.; GODELLE, B.; BOEMARE, N.; MOULIA, C. 2003. Effect of native *Xenorhabdus* on the fitness of their *Steinernema* hosts: contrasting types of interaction. Parasitol. Res. 91: 520-524.

WOODRING, J.L.; KAYA, H.K. 1988. Steinernematid and heterorhabditid nematodes. A handbook of biology techniques. Southern Cooperative Series Bulletin, vol. 331 Arkansas, USA: The nematodes Subcommitte of the Southern Regional Project 331; pp. 3-12.

Capítulo 2

Biología y Ecología

- Biología básica de *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934), cepa Colombia

- Efecto de extractos totales de Solanum tuberosum y malezas asociadas al cultivo, sobre el comportamiento y capacidad parasítica de Steinernema feltiae (Filipjev, 1934) (Rhabditida: Steinernematidae)

- Patogenicidad de 12 especies de hongos sobre JI de *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae), cepa Colombia

- Proceso de infección de *Steinernema feltiae* cepa Colombia, sobre larvas de *Tecia solanivora*

Biología básica de *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934), cepa Colombia

Triviño J.C.*, Luque J.E.** y Parada J.C.***

Resumen

Se determinó el crecimiento y desarrollo de *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934), cepa Colombia, sobre larvas de *Galleria mellonella*. Esta cepa presentó un ciclo de vida en 11 días con dos generaciones cuyos adultos anfimícticos presentaron protoginia evidente; además, un 76,5% de capacidad de penetración de JI a *G. mellonella* y diferencias en tamaño entre adultos, mas no diferencias entre estados juveniles en ambas generaciones. En dicha cepa, la capacidad de carga de hembras fue superior para las hembras de primera generación (994 huevos) respecto a las de segunda generación (252 huevos); la relación de sexos en ambas generaciones de desarrollo se presentó de 1:3 (macho: hembra) y una producción por larva de $9x10^{4}$ JI a partir de 100 JI liberados, proveniente de hembras de primera generación.

Palabras clave: *Steinernema feltiae*, *Galleria mellonella*, bionomía, anfimícticos.

Introducción

El nematodo entomoparásito (NE) *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) (Rhabditida: Steinernematidae) ha demostrado gran potencial en el control de plagas en suelo, y actualmente es ingrediente activo de

* Ingeniero Agrónomo, consultor y asesor del área agrícola.
** luqsan@cablecentro.net.co
*** insectsyco@icqmail.com

formulaciones comerciales de uso en cultivos de frutales, hortalizas, ornamentales y céspedes en Norteamérica y Europa, principalmente. Poblaciones de este nematodo han sido registradas en Argentina, Norteamérica, Australia, Europa continental, Hawaii, Nueva Zelanda, Turquía, Inglaterra e Irlanda. En Colombia se ha registrado en suelos del altiplano cundiboyacense, entre los 2.430 y 3.610 msnm, parasitando naturalmente larvas de insectos de importancia económica en el cultivo de papa, como *Tecia solanivora* y *Pthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) y *Premnotrypes vorax* (Coleoptera: Curculionidae) (Parada, 2001).

El registro de poblaciones de especies de NE ya descritos, no sólo amplía rangos de distribución geográfica, sino que anima a indagar sobre su realidad biológica respecto a poblaciones de áreas geográficas similares o disímiles a fin de explicar procesos de dispersión y adaptabilidad a ecosistemas, hábitat y hospedantes en condiciones naturales y artificiales.

La información biológica permite conocer y detectar diferencias morfológicas, reproductivas y poblacionales, conocimiento base para instaurar procesos de control de calidad en futuros eventos de producción comercial (Parada, 2001). Según lo anterior, el conocimiento de la biología de *S. feltiae,* cepa Colombia, a través de esta investigación aportó conocimiento sobre la variación en el tamaño del juvenil infectivo y demás estados de desarrollo en el tiempo, así como la capacidad de carga de hembras, la capacidad de penetración y la tasa emergencia de JI en larvas de *Galleria mellonella*, y la relación de sexos en adultos.

Materiales y métodos

Material entomológico

Se usaron larvas de último instar de *Galleria mellonella* (L) (Lepidoptera: Pyralidae) como especie modelo para el desarrollo de los trabajos de

biología de *S. feltiae,* cepa Colombia. Para la producción de los nematodos se usó, además, *Achroia grisella* (L) (Lepidoptera: Pyralidae), ambas denominadas polillas de la cera. Las larvas de estos insectos fueron criadas en dieta artificial (Sáenz y Luque 2001, Corredor 2001) a una temperatura entre 21 y 23 °C, con periodos de luz y oscuridad de 12 horas en un cuarto de cría.

Cría del nematodo

Se almacenaron los JI en cajas de petri plásticas de 15 cm de diámetro, con arena de río, tamizada (con grano entre 0,5 y 1 mm de diámetro), lavada y esterilizada en horno a 300 °C; se almacenaron entre 4.000 y 5.000 JI por gramo de arena, con una humedad entre 15 y 20 %. Sobre estas cajas se liberaron larvas de *G. mellonella* o de *A. grisella* y se almacenaron en bolsas negras (capacidad de 2 kg) en una cámara de incubación oscura, a 21 °C.

Las larvas muertas se colocaron en cámaras "White". Al iniciarse la emergencia de JI, se lavaron las cajas con agua destilada para extraer los nemátodos; éstos fueron lavados con agua destilada y gotas de Tritón® X100 para eliminar la grasa. Una vez lavados, se contaron por el método de diluciones usado por Stock (1998) y se almacenaron en arena bajo oscuridad en bolsas plásticas negras.

Variación de largo y ancho máximos de los estados de desarrollo de *Steinernema feltiae* cepa Colombia

Se inocularon larvas de último instar de *G. mellonella* con JI sobre arena de río, con un tamaño de partícula entre 500 y 1.000 micras de diámetro, esterilizada previamente por calor. Este sustrato se dispuso en cajas para cultivo de tejidos de 12 cavidades, con aproximadamente 100 JI por larva, y una larva por cavidad (con un peso promedio por larva de 0,215 g.), a una temperatura de 21 ºC. Después de la

inoculación de todas las cajas, se tomaron 5 larvas al azar cada 12 horas, se disectaron y lavaron con agua destilada para extraer los nematodos. Se concentraron en un tubo de ensayo, se sometieron a 60 ºC por 30 segundos para matarlos y se les agregó TAF caliente (50 ºC) en relación 1:1. Se montaron especímenes en láminas de vidrio con círculos de parafina para realizar las mediciones en micras (un mínimo de 30 individuos en cada estado de desarrollo) y determinar por observación los estados de desarrollo de *S. feltiae* a través del tiempo. Los datos fueron tabulados por horas, tomando medidas de largo y ancho máximo del cuerpo del nematodo. Se establecieron intervalos de confianza (a = 0,05) para los rangos de las medidas de largo y ancho de cada estado de desarrollo, un análisis de varianza y una prueba de Tukey (a = 0,05) para establecer diferencias entre el tamaño de estados de las dos generaciones de nematodos. Luego, se procedió a comparar los JI y los machos de primera generación con otras medidas de *S. feltiae* registradas por Wouts (1980), Hominick *et al.* (1997), Sáenz y Luque (2000 a) y Parada (2001), con el fin de observar las posibles diferencias entre poblaciones de este nematodo.

Crecimiento poblacional y desarrollo de *Steinernema feltiae*, cepa Colombia. El objetivo de este experimento fue estudiar el desarrollo poblacional de los estados de *S. feltiae* cepa Colombia sobre larvas de *G. mellonella* en condiciones de laboratorio. Fueron expuestas 200 larvas de último instar de *G. mellonella* con un peso promedio de 0,226 g/larva, en cajas para cultivo de tejidos de 12 cavidades (21 ºC, 100 JI por larva). Cada 12 horas se seleccionaron 10 larvas al azar para disección. El contenido de las larvas se lavó y se homogenizó por agitación manual en tubos de ensayo de 20 ml, luego se separaron los tejidos gruesos de la larva de la solución de nematodos a través de un tamiz de 1 mm de apertura. El sobrenadante se lavó con agua destilada continuamente hasta obtener una muestra clara que se pudiera observar en el estereoscopio, para contar los nematodos en cada estado de desarrollo de *S. feltiae*.

La **capacidad de penetración de hospedante (CPh)** de JI de *S. feltiae* se calculó como la eficiencia de la población inicial a la que son expuestas larvas de *G. mellonella*, y el porcentaje sobre el número máximo de JI que penetraron hasta las 72 horas, ya que después de este tiempo se comienza a presentar pérdida de hembras de primera generación. La CPh se calculó de la siguiente forma: (No. de nematodos dentro de la larva/Total de nematodos liberados) x 100.

La **tasa de emergencia de JI** se calculó en 10 larvas de *G. mellonella* sin disectar sobre trampas "White" individuales, entre las 228 y las 264 horas luego de la exposición. Se hizo un análisis de varianza a la capacidad de penetración de hospedante y a la tasa de emergencia de JI de *S. feltiae* de larvas de *G. mellonella,* y al cambio poblacional de estados de desarrollo de *S. feltiae* dentro del hospedante. Para observar dominancia de un estado determinado se hizo una transformación en términos de porcentaje al promedio de nemátodos por estado sobre el total de nematodos por hora de medición.

Se tomaron al azar 30 hembras de primera generación y 30 hembras de segunda generación, las cuales fueron disectadas para contar el número de huevos en su interior, con el fin de estimar su potencial reproductivo.

Resultados y discusión

Capacidad de penetración de JI. El análisis de varianza para la capacidad de penetración se hizo en intervalos cada 24 horas, presentando diferencias en la penetración de JI en larvas de *G. mellonella* entre periodos de tiempo (Gl = 2; F = 31,23; P = 2,92; CV = 30,85).
La máxima población de JI se obtuvo a las 72 horas, ya que hacia las 84 horas menos del 0,4% de la población eran JI. Se encontró que el

Tabla 1. Capacidad de penetración de infectivos juveniles (JI) de *S. feltiae,* cepa Colombia, en larvas de *G. mellonella* sobre el total de JI liberados por unidad experimental (N = 100, promedio por larva para cada hora)

Tiempo De Exposición (Horas)	Nematodos Por Larva	Porcentaje Penetración	Porcentaje Acumulado
0 12	6,00	6,00	6,00
12 24	15,50	15,50	21,50
24 48	32,70	32,70	54,20
48 72	22,30	22,30	76,50
TOTAL	76,50	76,50	

porcentaje máximo de penetración ocurrió hacia las 24 a 48 horas de exposición, donde el 54,2% de la población liberada había penetrado en la larva (tabla 1).

Capacidad de carga de hembras. De las disecciones hechas a hembras de primera generación se obtuvo un promedio de 994,6 huevos por hembra (ds = 277,07) y para las de segunda generación un promedio de 252,5 huevos por hembra (ds = 86,08). De este experimento se deduce que:

- Las hembras de primera generación tienen más cantidad de huevos porque disponen de mayor cantidad de alimento y de mejor calidad, y más espacio, teniendo su progenie más posibilidades de sobrevivir.
- para el caso de las hembras de segunda generación, la condición de densidad poblacional dentro del hospedante fue más alta, por eso maduraron rápidamente; además, son más pequeñas y con menor carga de huevos. Si las condiciones aún son favorables, ellas ovipositan, de lo contrario se sacrifican en una

condición de viviparidad matricida, incluso cuando las hembras han emergido del cadáver del insecto, disminuyendo el número de JI que se pueden desarrollar de ellas.

Relación de sexos de adultos. La proporción de hembras es superior en las dos generaciones de nematodos, iniciando la primera generación de adultos hacia las 48 horas, hasta las 216 horas. La segunda generación de adultos se inicia hacia las 192 y dura hasta la emergencia total de los JI, hacia las 264 horas; las dos generaciones de adultos se traslapan entre las 192 y 216 horas.

En la primera generación se alcanza una relación de sexos promedio de 3,5 hembras por cada macho; en la segunda generación se logra un máximo de 3,8 hembras por macho y es oscilante a medida que mueren y se desarrollan nuevas hembras, mostrando, a nivel general o al menos para este caso, la misma proporción de sexos entre las dos generaciones. El cambio, a medida que transcurre el tiempo, la proporción macho-hembra estaría dada por la mayor longevidad de los machos respecto a las hembras (Sáenz y Luque, 2000 a); además, dicho aspecto está influenciado por la disparidad en la maduración de los JI que invaden asincrónicamente el hospedero y por la habilidad individual que tenga cada infectivo para alimentarse y desarrollarse.

Tasa de emergencia de JI de *S. feltiae.* En el análisis de varianza para la tasa de emergencia se presentó diferencia en la migración de JI de cadáveres de *G. mellonella* para cada periodo de tiempo (Gl = 2; F = 31,23; P = 2,92; CV = 113,67).

La emergencia de JI de *S. feltiae,* cepa Colombia, de cadáveres de larvas de *G. mellonella* se inició en estas muestras hacia las 228 horas, con una baja tasa de emergencia de JI; la máxima migración fuera del hospedero ocurrió hacia las 240 horas, con un 70,64% y un acumulado del 79,33% del promedio del total cosechado. En este periodo se

presentó una migración de machos y hembras grávidas en algunas larvas, pero hacia las 252 horas la migración de adultos disminuyó y emergieron sólo hembras grávidas en menor proporción al periodo anterior.

La eficiencia en la producción de JI de esta cepa en larvas de *G. mellonella* estuvo alrededor de 90.000 JI, con un inóculo de 100 JI por larva, en contraste con Sáenz y Luque (2000 b), que presentaron, para la cepa Villapinzón, una producción de JI de 65.000 JI por larva de *G. mellonella,* con un inóculo de 500 JI. Esto estaría relacionado con la capacidad de carga de las hembras de primera generación y posiblemente por el aumento en la viabilidad de los huevos, que pudo ser baja para la cepa Villapinzón.

Variación de largo y ancho máximo de *Steinernema feltiae,* cepa Colombia. El análisis de varianza para la variable *largo* encontró diferencias significativas entre tamaños de los estados de desarrollo de *S. feltiae* (Gl = 14; F = 83,25; P < 0,01; CV = 44,86), al igual para la transformación logaritmo (G1 = 14; F = 293,43; P<0,01; CV = 3,06) respecto al largo. La prueba de Tukey para *largo* (a = 0,05, t = 4,82; msd = 549,49) y la prueba para la transformación logaritmo (a = 0,05; t = 4,82; msd = 0,24), presentan el mismo patrón. Los intervalos de confianza (a = 0,05) se presentan en la tabla 2, donde se aprecian las diferencias entre adultos de ambas generaciones.

El análisis de varianza para *ancho* indica que hay diferencias significativas entre estados de desarrollo de *S. feltiae* respecto al ancho (Gl = 14; F = 182,59; P < 0,01; CV = 3,39), lo mismo para la transformación logaritmo (Gl = 14; F = 409,87; P < 0,01; CV = 4,98). La prueba de Tukey para *ancho* (a = 0,05; t = 4,82; msd = 24,6) y la prueba para logaritmo (a = 0,05; t = 4,82; msd = 0,23), presentan el mismo patrón. Los intervalos de confianza (a = 0,05) se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Medidas de largo y ancho máximos en micras, de los estados de desarrollo de *Steinernema feltiae*, cepa Colombia, con intervalos de confianza para cada estado (a = 0,05). Estados con letras distintas presentan diferencias significativas para largo (Tukey a = 0,05). (JIVL = JI antes de penetrar la larva; JII = JI dentro de la larva; J4MI y J4HI = J4 macho y J4 hembra de 1ª generación; MI y HI adultos de 1ª generación; J1I Y J2I = juveniles de la 1ª generación; JIII = JI de 2ª generación; J4MII y J4HII = J4 de 2ª generación; MII y HII = adultos de 2ª generación; J1II Y J2II = juveniles de la 2ª generación; JIINF = JI de vida libre).

ESTADÍO	Largo		Ancho	
	Promedio	Desv.	Promedio	Desv.
HI	3194,5	234,0	173,84	7,8
HII	1724,8	85,4	136,03	5,6
MI	1257,1	37,2966	109,65	5,1
J4I	1035,9	29,0	81,08	3,6
J4II	1026,8	39,9	67,61	2,1
MII	903,33	22,3	53,32	2,5
J3INF	818,95	12,8	34,46	0,7
J3VL	767,1	9,8	33,40	0,8
J3I	778,12	12,6	31,56	0,8
J3II	689,84	13,4	26,2	0,5
J2II	443,67	25,0	25,57	0,4
J2I	408,35	11,3	24,83	1,6
J1II	297,36	8,9	19,57	1,2
J1I	268,03	6,6	19,36	0,3

Se encontró que, en proporción, las hembras de *S. feltiae,* cepa Colombia, de primera generación son más grandes que las hembras de segunda generación, lo mismo sucedió con los machos. El estado juvenil 4 (J4) para ambas generaciones no presentó diferencias en su tamaño, con excepción del J4I, que es más ancho que el J4II. En los estados JI no hubo diferencias significativas entre el JI que se usó como inoculo inicial, el JI que ingresó al insecto y el JI como infectivo juvenil al salir del cadáver del hospedero; el JI proveniente de hembras de primera generación fue más pequeño que los JI medidos anteriormente, pero la prueba de Tukey lo ubica dentro de este grupo. Los estados J1 y J2 de ambas generaciones no presentaron diferencias en tamaño.

Este ensayo presenta la plasticidad de los estados de *Steinernema feltiae,* cepa Colombia, respecto a los estados adultos, donde la disponibilidad del alimento influye sobre el desarrollo y el tamaño de los nematodos en cada estado.

La tendencia de los estados juveniles a permanecer invariables en su talla estaría relacionada con la densidad poblacional de individuos en la larva, ya que estos, por su tamaño, comen menos que un pre-adulto, lo que induce a que los J4 de segunda generación maduren rápidamente a adultos y se inicie un nuevo ciclo corto con adultos más pequeños y hembras con poca carga de huevos. Jackson y Brooks (1995) afirman que el tamaño del JI resultante es afectado por la calidad del hospedero.

Tabla 3. Valores de largo y ancho en micras, de JI y machos de varias cepas de *S. feltiae*

AUTOR	ESTADO	LARGO		ANCHO	
		MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO
Wouts, (1980)	JI	800	750-950	25	22-27
	MACHO	934	850-1000	75	60-90
Hominick (1997)	JI	849	736-950	26	22-31
	MACHO	-	-	75	60-90
Sáenz y Luque (2000a)	JI	800	680-900	26	24-34
	MACHO	1250	1085-1430	86	82-98
Parada (2001)	JI	808	631-914	25	20-30
	MACHO	916	823-986	77	59-91
Presente estudio	JI	819	713-933	26	22-31
	MACHO	1257	891-1646	136	94-189

En el presente estudio, las medidas de largo y ancho de JI y machos de primera generación se compararon con los datos para *S. feltiae* obtenidos de Wouts (1980) para una cepa de Nueva Zelanda, los de Hominick *et al.* (1997) para cepas del Reino Unido, los datos de Sáenz y Luque (2000a) de la cepa Villapinzón y los de Parada (2001) de las

poblaciones de Cundinamarca y Boyacá. En la tabla 3 se presentan los datos comparativos para largo y ancho.

Los caracteres morfológicos de las 5 poblaciones coinciden con la especie *Steinernema feltiae* según los registros. Observando los caracteres de medida de largo y ancho se puede observar variabilidad entre las mismas poblaciones, principalmente entre el tamaño de los machos, donde las poblaciones de este estudio y las de Sáenz y Luque (2000) son muy similares, con excepción del ancho, pues en este experimento se presentaron machos más robustos, debido quizá a la baja densidad de nemátodos por larva en el momento de los muestreos, lo que indujo a que los machos crecieran más al disponer de mejores condiciones del hospedero. Lo anterior mostró diferencias entre las poblaciones, permitiendo usar el nombre de cepas.

En el estado de JI, las variaciones en largo y ancho de las 5 poblaciones son muy similares, incluyendo los rangos; esto indica que el estado infectivo conserva mejor el fenotipo de la especie, demostrando la importancia de la morfometría de este estado en la clasificación taxonómica de nematodos entomoparásitos. La similitud entre las poblaciones colombianas se debe a que la cepa utilizada en este estudio es producto de de la hibridación de la cepa Villapinzón y las poblaciones de *S. feltiae* de Cundinamarca y Boyacá, siendo denominada cepa Colombia, debido a que la morfometría y el comportamiento en general para las poblaciones de *S. feltiae* para esta zona no difiere, según el registro de Parada (2001).

Crecimiento poblacional y desarrollo de *Steinernema feltiae*, cepa Colombia. El proceso del ciclo de vida de *S. feltiae,* cepa Colombia, se puede apreciar en la tabla 4, donde se observan los cambios generacionales y traslapes de estados de desarrollo predominantes del nematodo. La curva de crecimiento total de individuos por hora presenta diferencias significativas entre periodos de tiempo, según el

análisis de varianza (Gl = 18; F = 34,80; P < 1,67; CV = 54,57), lo cual se corrobora con un crecimiento progresivo.

En el proceso de desarrollo de *S. feltiae,* cepa Colombia, en larvas de *G. mellonella,* se presentan traslapes de estados de desarrollo del nematodo en las diferentes horas de medición, donde el predominio del estado JII (JI que penetra la larva) está durante las primeras 72 horas (99% de la población que ingresa aproximadamente), con una rápida maduración de J4 hembras y posteriormente de machos, una población alta de hembras de primera generación antes de las 84 horas luego de la exposición de las larvas a los JI de *S. feltiae*. A partir de las 96 horas, el predominio de los estados inmaduros provenientes de la población inicial (J1, J2 y JI) prevalece en proporción numérica respecto a los estados preadultos y adultos. Hacia las 144 horas se inicia el desarrollo de una segunda generación de nematodos, madurando sólo una pequeña proporción de JI (1 a 2% de la población total).

Ocurre un traslape de generaciones de adultos entre las 192 y las 240 horas, periodo en el que parte de la población de JI que no maduró ha iniciado la emergencia del cadáver. Aunque esta población temprana de JI tiende a resistir poco en el ambiente, ya que no los individuos no han fijado bien la cutícula exterior y quedan vulnerables a los factores del ambiente (Parada, com. pers.). La alta densidad de nemátodos provocó un estrés en los adultos de la segunda generación, haciendo que tanto machos como hembras migraran fuera del cadáver en algunas muestras, siendo estas últimas más pequeñas y con pocos huevos en su útero, desarrollando una viviparidad matricida. El ciclo dentro del hospedante se completó en 264 horas, luego de la exposición de larvas de *G. mellonella*.

Respecto al comportamiento de la población total de nemátodos, se presentó una curva sigmoidea, con un periodo tardío de crecimiento entre las 0 y 86 horas, tiempo en el que se inicia un crecimiento

progresivo hasta completar un máximo promedio de 90447,3 nematodos JI (JIINF) a las 264 horas, a partir de un promedio máximo de 76,5 JI que ingresaron hasta las 72 horas, dando una producción extrapolada de 400208 JI por gramo de larvas de *G. mellonella* (partiendo de 0,226 g/larva).

Los juveniles infectivos de *S. feltiae* penetraron los hospederos por etapas, al seguir señales tales como concentraciones de CO_2, exudados cuticulares y heces (Sáenz y Luque, 2000a). Los primeros JI que penetran el insecto preparan el hospedero liberando la bacteria simbionte, luego de haber eliminado por medio de proteasas las defensas del hospedante, y permitiendo así el crecimiento de la bacteria en el hemocele; esta preparación es en beneficio de la población que entra en el siguiente periodo de tiempo (24 a 48 horas), continuando con una tercera población de JI que penetra el hospedante entre las 48 y 72 horas, donde ya hay presencia de adultos de primera generación. El número de JI que pueda penetrar hasta las 96 horas es mínimo, ya que el hospedante ha llegado a su capacidad de carga de infectivos juveniles y se está desarrollando una población de J1 y J2. Esta disparidad en la penetración de nematodos conlleva a que se presente un traslape de poblaciones de estados en un mismo instante, donde los primeros estados que se desarrollan llevan ventaja pues sus oportunidades de éxito son mayores.

Bohanan y Hominick (1997a), referenciados por Stuart *et al* (1998), argumentan que hembras de *S. feltiae* tienden a colonizar los hospederos más rápidamente que los machos bajo ciertas condiciones experimentales, encontrando que para *S. glaseri* tanto hembras como machos invadieron larvas de *G. mellonella* durante las primeras 14 horas, sin haber diferencia significativa entre diversos tiempos de exposición. Lo anterior al ser comparado con lo observado en los dos experimentos, confirma que *S. feltiae,* cepa Colombia, presenta una diferenciación temprana de hembras (protoginia), ya que las de primera

generación son más grandes y necesitan más tiempo para crecer y madurar respecto a los machos, que son más pequeños y necesitan de menor tiempo para alcanzar su madurez fisiológica. Esto se aprecia en la tabla 4, donde los J4 hembras predominan en el periodo de 24 a 48 horas, mostrando aumento de hembras de primera generación en los siguientes periodos, lo que indica que un macho puede copular con más de una hembra, tanto en la primera como en la segunda generación.

Según Lewis y Gaugler (1994), la relación de sexos no estaría influenciada por el hospedero ya que en experimentos no hubo diferencias en la proporción de sexo de nematodos de *S. glaseri* criados en larvas de *G. mellonella* y en agar lipídico; pero según Sáenz y Luque (2000), la temperatura hace variar la relación de sexos con disminución en la proporción de hembras.

En larvas expuestas a largos periodos, como es el caso de este experimento, fueron encontrados JI al mismo tiempo que se encontraban adultos (Stuart *et al,* 1998). Los primeros nematodos que invaden satisfactoriamente y se desarrollan en adultos están disfrutando probablemente de ventajas en competencia por cópulas, iniciando la reproducción y contribuyendo a la completa salida reproductiva del cadáver.
Los JI que emergen tempranamente tienden a ser más largos, menos móviles y responden más a las entradas del hospedero que los más tardíos. Stuart *et al.* (1996), referenciados por Stuart *et al.* (1998), sugieren que estas diferencias estarían dadas por las condiciones nutricionales dentro del cadáver del insecto, mientras que los nemátodos se desarrollan, pero también in**d**ica que los JI emergentes tardíos están programados para una amplia dispersión. Tal estrategia podría ser altamente adaptativa desde que los JI tempranos probablemente ya han infectado un insecto cercano, y comienzan a establecerse, mientras los JI tardíos emergen.

En la tabla 4 se aprecian traslapes de estados en un mismo instante, lo que se presenta por diferencias en la maduración de los estados influenciado por la densidad poblacional dentro del hospedero y por la cantidad de alimento disponible (Jackson y Brooks, 1995). Además, la formación de una gran población de JI, derivada de la gran capacidad de producción de huevos de las hembras de primera generación que, adicionado a su alta relación de sexos en las primeras horas, tienen más progenie que las hembras de segunda generación. De estos JI, el mayor porcentaje emergerá del cadáver del hospedero, mientras que una fracción de ellos, quizá los más precoces, madurarán rápidamente a machos y hembras de segunda generación, creando una segunda población tardía de JI que emergerán posteriormente del hospedante y/o se alimentarán de hembras que hayan emergido, generando una viviparidad matricida.

Tabla 4. Presencia y traslapes de estados de desarrollo de *S. feltiae,* cepa Colombia, en larvas de último instar de *G. mellonella*. (JII = JI dentro de la larva; J4MI y J4HI = J4 macho y J4 hembra de 1ª generación; MI y HI adultos de primera generación; J4MII y J4HII = J4 de 2ª generación; MII y HII = adultos de 2ª generación; JIINF = JI de vida libre. Los estados resaltados son los predominantes para cada hora).

Hora	Estados de desarrollo de *S. feltiae* cepa Colombia											
12	JII											
24	JII	J4M	J4H									
48	JII	J4M	J4H	M	H							
72	JII	J4M	J4H	M	H							
84	JII	J4M	J4H	M	H							
96	JII	J4M	J4H	M	H	J1J2						
108		J4M	J4H	M	H	J1J2						
120		J4M	J4H	M	H	J1J2						
132				M	H	J1J2	JI					
144				M	H	J1J2	JI	J4MII	J4HII			
156				M	H	J1J2	JI	J4MII	J4HII			
168				M	H	J1J2	JI	J4MII	J4HII			
180				M	H	J1J2	JI	J4MII	J4HII			
192				M	H	J1J2	JI	J4MII	J4HII	MII	HII	
204				M	H	J1J2	JI	J4MII	J4HII	MII	HII	
216				M	H	J1J2	JI	J4MII	J4HII	MII	HII	
240						J1J2	JI	J4MII	J4HII	MII	HII	
252							JI			MII	HII	JIINF
264										MII	HII	JIINF

El mayor porcentaje de JI que abandona el cadáver lo hace entre las primeras 24 horas de iniciada la emergencia de los primeros JI, debido quizá a un mensaje emitido por la bacteria, similar a lo sucedido con *P. luminescens* en cultivos *in vitro* de *Heterorhabditis* sp. (Strauch y Ehlers, 1998), y también a la alta densidad de nematodos dentro de la larva, aunque en condiciones de estrés los adultos puedan emerger y para el caso de las hembras, continuar con su función fuera del hospedero.

Es común que ocasionalmente puedan emerger adultos bajo condiciones naturales de los cadáveres agotados, ya que Millar y Barbercheck (2001) encontraron machos de *S. riobravis* en muestras de suelo después de liberar el nematodo en pruebas de campo, formando núcleos en algunas muestras.

La población denominada cepa Colombia es el producto de la mezcla de poblaciones de *S. feltiae* aisladas en el altiplano cundiboyacense. Dicha cepa presenta mejores características en su biología, viéndose reflejado en la patogenicidad, capacidad de penetración, eficiencia en la producción y actividad del JI. Este nematodo mostró pocas variaciones en el estado infectivo en su morfometría, respecto a otras poblaciones de *S. feltiae*.

La variación largo-ancho de *Steinernema feltiae* cepa Colombia, presenta cambios a nivel de estados adultos de las dos generaciones anfimícticas, en comparación con la no variación de los estados juveniles, lo que estaría dado por las condiciones del hospedante con una maduración temprana de hembras. Además, presenta un modelo de patrón a seguir como control de calidad en crías *in vivo* y en posibles desarrollos de cría masiva *in-vitro* del nematodo, ya que presenta parámetros de condiciones ideales de crecimiento (talla) y desarrollo. *S. feltiae,* cepa Colombia, posee una buena capacidad de penetración de hospedero, que sumado a una relación de sexos de predominio de hembras en ambas generaciones y a la capacidad de carga de huevos

promedio, puede usarse como modelo para estimar la producción de JI *in vivo*, con el fin de ser utilizado en experimentos de campo y como base para establecer un modelo de cría *in vitro* con fines comerciales.

Referencias

CORREDOR, T. 2001, Procedimientos para la producción masiva *in vivo* de nematodos entomoparásitos. En Memorias del seminario. Nematodos entomoparásitos, una alternativa en MIP. Bogotá, Agosto 24 de 2001.

HOMINICK, W.M.; BRISCOE, B.R.; DEL PINO, F.G.; HENG, J.; HUNT, D.J.; KOZODOY, E.; MRACEK, Z.; NGUYEN, K.B.; REID, A.P.; SPIRIDONOV, S.; STOCK, P.; STURHAN, D.; WATURU, C.; YOSHIDA, M. 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: current status, protocols and definitions. J. Helminthology 71, 271-298.

JACKSON, J.J.; BROOKS, M.A. 1995. Parasitism of Western Corn Root-worm Larvae and Pupae by *Steinernema carpocapsae.* J. Nematology. 27 (1), 15-20.

LEWIS, E.E.; GAUGLER, R. 1994. Entomopathogenic nematode (Rhabditida: Steinernematidae) Sex ratio relates to foraging strategy. J. Invertebr. Pathol. 64, 238-242.

MILLAR, L.C.; BARBERCHECK, M.E. 2001. Interaction between endemic and introduced entomopathogenic nematodes in conventional-Till and no-Till corn. Biological control. 22, 235-245.

PARADA, J. 2001. Steinernematidae y Heterorhabditidae en áreas de producción papera en Cundinamarca y sur de Boyacá. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C.

SÁENZ A., A.; LUQUE Z., J.E. 2000a. Ciclo de vida del entomonematodo *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934). Agricultura Colombiana. 17 (1-3) 17-24. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Santafé de Bogotá D.C.

SÁENZ A., A.; LUQUE Z., J.E. 2000b. Cultivo *in vivo* y métodos de almacenamiento para juveniles infectivos *Steinernema feltiae* (Rhabdita: Steinernematidae). Agricultura Colombiana. 17 (1-3) 37-42. Universidad

Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Santafé de Bogotá D.C.

STOCK, P. 1998. Sistemática y biología de nematodos parásitos y asociados a insectos de importancia económica. Universidad Nacional del Litoral Esperanza, Santa Fe, Argentina. Octubre 12-16.

STUART, R.J.; ABU HATAB, M.; GAUGLER, R. 1998. Sex ratio and infection process in entomopathogenic nematodes: are males the colonizing sex? J. Inv. Pathol. 72. 288-295.

STRAUCH, O. A; EHLERS, R.U. 1998. Food signal production of *Photorhabdus luminescens* inducing the recovery of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp. in liquid culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50, 369-374.

WOUTS, W.M. 1980. Biology, life cycle and redescription of *Neoaplectana bibionis* Bovien, 1937, Nematoda: Steinernematidae. J. Nematology 12 (1). 62-71,

Efecto de extractos totales de Solanum tuberosum y malezas asociadas al cultivo, sobre el comportamiento y capacidad parasítica de Steinernema feltiae (Filipjev, 1934) (Rhabditida: Steinernematidae)

Palacios L.[*], Luque J. E.[**] y Parada, J.C.[***]

Resumen

Bajo condiciones de laboratorio se examinó la respuesta de juveniles infectivos *Steinernema feltiae* (Filivjep, 1934) (Rhabditida: Steinernematidae) ante fuentes de estímulo, como macerados de raíz tanto de *S. phureja* como de *S. tuberosum*; larvas del IV instar de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae); macerado de raíz más larvas de IV instar de *T. solanivora* y agua destilada estéril. Las fuentes se localizaron individualmente y por grupos dentro de cajas de petri tipo cuadrante, realizando observaciones en dos series de tiempo, cada 10 minutos entre los 10 y 30 minutos, y cada hora entre los 60 y 180 minutos. De igual manera, se evaluó el comportamiento de infección del nematodo sobre larvas de *T. solanivora* en suelo con extractos totales de *Solanum phureja*, *S. tuberosum*, *Rumex crispus*, *Holcus lanatus*, *Poligonum segetum*, y *Spergula arvensis.* En todos los casos los juveniles infectivos son atraídos hacia todas las fuentes sin mostrar efectos deletéreos o cambios en comportamiento del nematodo y bajo condiciones de suelo con extractos de raíces; hacia las 72 horas presenta hasta un 100% de infección sobre *T. solanivora*. Se evidencia así la no interferencia de la planta dentro de la relación patógeno-plaga, condición

---

[*] Ingeniera Agrónoma, Instructora SENA, Regional Meta.
[**] luqsan@cablecentro.net.co
[***] insectsyco@icqmail.com

que favorecería el éxito de *S. feltiae* sobre *T. solanivora* bajo condiciones de cultivo.

Palabras clave: nematodos entomoparásitos, taxias, control biológico, *Steinernema feltiae*, *Tecia solanivora*, *Solanum* spp.

Introducción

Aunque el potencial de nematodos entomoparásitos de la familia Steinernematidae en el control de insectos plaga es cada día mas reconocido dentro de programas de manejo integrado, algunas evaluaciones con frecuencia han mostrado variabilidad en el control de ciertas plagas. Varios estudios se han adelantado para conocer sobre rangos de hospedantes, comportamiento de encuentro del hospedante y factores físicos y químicos del suelo que pueden llegar a variar la efectividad del nematodo (Gaugler y Kaya, 1999), pero son relativamente pocos los que han enfocado agentes abióticos que afecten el comportamiento, la eficacia y la sobrevivencia de los nematodos entomoparásitos (Kaya y Koppenhofer, 1996; Timper *et al.*, 1991).

La eficacia de los biocontroladores de insectos ha sido investigada sin tener en cuenta el efecto de la planta hospedante de la plaga sobre el comportamiento y virulencia del biocontrolador. Barbercheck *et al.* (1995) son algunos de los que han indagado sobre la acción mediadora de metabolitos secundarios entre la relación biocontrolador-plaga, teniendo en cuenta principalmente que la quimiorecepción es el principal sistema sensorial usado por los nematodos para localizar a su hospedante. Las plantas hospedantes de plagas pueden afectar el comportamiento y/o virulencia de patógenos controladores de insectos, aumentando o disminuyendo el impacto de la plaga sobre la planta. El efecto antagónico de plantas hospedantes sobre patógenos de insectos ha sido demostrado con hongos, bacterias (Timper y Brodie, 1993) y en nematodos entomoparásitos, que aunque se movilicen entre raíces

de ciertas plantas, pueden verse afectados por sustancias liberadas por raíces de otras, que desorientan o son repulsivas para los nematodos (Kanagy y Kaya, 1996; (Barbercheck *et al*, 1995; Hui y Webster, 2000). Estos efectos indican el potencial impacto sobre los biocontroladores por parte de factores propios medio ambientales del suelo y de la relación planta-plaga-controlador.

Teniendo en cuenta este planteamiento, el presente estudio buscó conocer las posibles respuestas de juveniles infectivos de *S. feltiae* respecto a extractos totales de *S. phureja*, *S. tuberosum* var pastusa y cuatro malezas comunes en cultivos de papa: *Rumex crispus* (raíz y área foliar), *Holcus lanatus* (raíces), *Poligonum segetum* (raíz y área foliar), *Spergula arvensis* (raíz y área foliar), colectadas en cultivos de papa en Subachoque (Cundinamarca).

Si la señales emitidas por las fuentes de estímulo afectan el comportamiento y parasitismo, estableceríamos que el comportamiento de forrajeo del nematodo cambia cuando está expuesto a dichas señales, dependiendo si éstas actúan individualmente o combinadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para evidenciar el efecto de la planta hospedante de la plaga se evaluaron extractos totales de raíces de plantas de *Solanum tuberosum* de las variedades Capiro, Monserrate, Morita y Pastusa (tabla 1); así mismo, se evaluaron extractos totales de tubérculos de las variedades Capiro, Monserrate, Morita y Única, recolectadas en el Centro de Investigación San Jorge. De las malezas más comunes en el cultivo papa se escogieron las ya mencionadas.

Del mismo modo, se evaluaron extractos totales de *Ricinus comunis* (área foliar), *Ruta graveolens* (área foliar) y *Tagetes zipaquirensis* (raíz) que ha reportado efecto nematicida sobre *Meloidogyne incognita* (Camelo, 1994).

Tabla 1. Especies vegetales utilizadas para la elaboración de los extractos.

Nombre científico	Familia	Nombre común
Solanum tuberosum	Solanaceae	Papa de año
Holcus lanatus	Gramineae	Falsa poa, pasto lanudo
Poligonum segetum	Polygonaceae	Barbasco, gualola
Ricinus comunis	Euphorbiaceae	Higuerilla, ricino
Rumex crispus	Polygonaceae	Romasa, lenguevaca, Ruibarbo
Ruta graveolens	Rutaceae	Ruda de castilla
Spergula arvensis	Cariophyllaceae	Abrojito, mioña, cilantrillo
Tagetes zipaquirensis	Compositae	Ruda de arado

De las plantas y tubérculos se evaluaron los extractos totales en agua destilada estéril (ADE). Para la preparación de los extractos se procesaron muestras de raíces y área foliar, las cuales se secaron por 12 horas a 60 °C. Posteriormente, las muestras se molieron para disminuir el tamaño de las partículas y obtener una solución más concentrada. De los tubérculos se procesaron cortes frescos. Para todos los casos se usó como solvente ADE, tomando una equivalencia de 1 g de muestra seca por 10 ml de ADE; esta mezcla se expuso a baño de María a una temperatura de 50 °C, con agitación de 150 rpm por 3 horas. Seguido, se filtró al vacío para la obtención del extracto.

Las evaluaciones se realizaron en viales de vidrio de 5 x 2,5 cm, conteniendo 12 g de suelo pasteurizado. Los tratamientos correspondieron a: T1: juveniles infectivos + larva (JI/L) (Testigo); T2: extracto + larva (Ex/L); T3: juveniles infectivos + extracto + larva (JI/Ex/L); T4: juveniles infectivos + extracto (JI/Ex).

Cada tratamiento constó de 10 repeticiones y se usaron como insectos cebo larvas de último instar de *T. solanivora* y *A. grisella*, 1 ml del

extracto y 100 JI/ml, localizados en el fondo de los viales (figura. 1). Por cada vial se liberó una larva sobre el suelo para los tratamientos T1, T2 y T3 que llevan larva. Posteriormente se sellaron con vinipel, se invirtieron y se almacenaron a temperatura ambiente y oscuridad. Pasadas 72 horas se verificó la mortalidad de las larvas y el número de nematodos dentro de las mismas; para el T4 se recuperaron los JI del suelo por la técnica del embudo Baermann (Zuckerman, 1990).

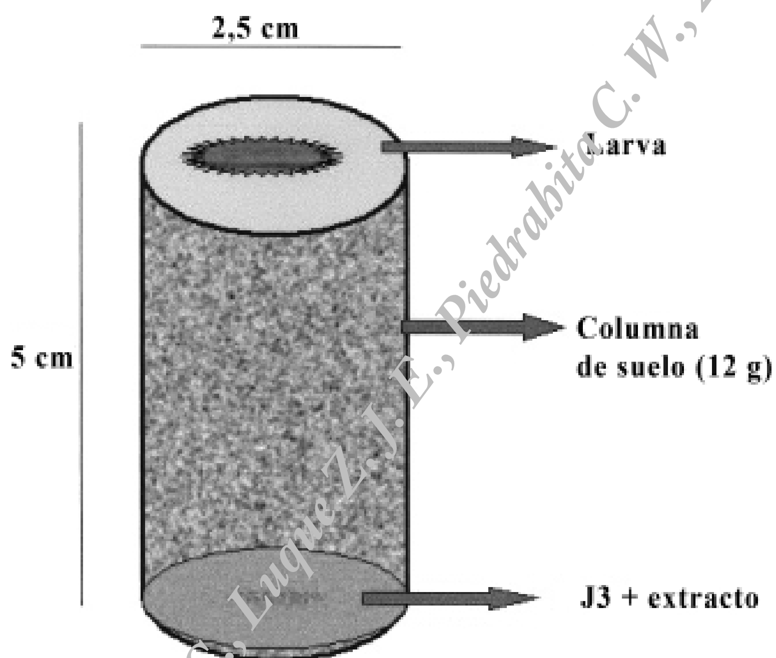
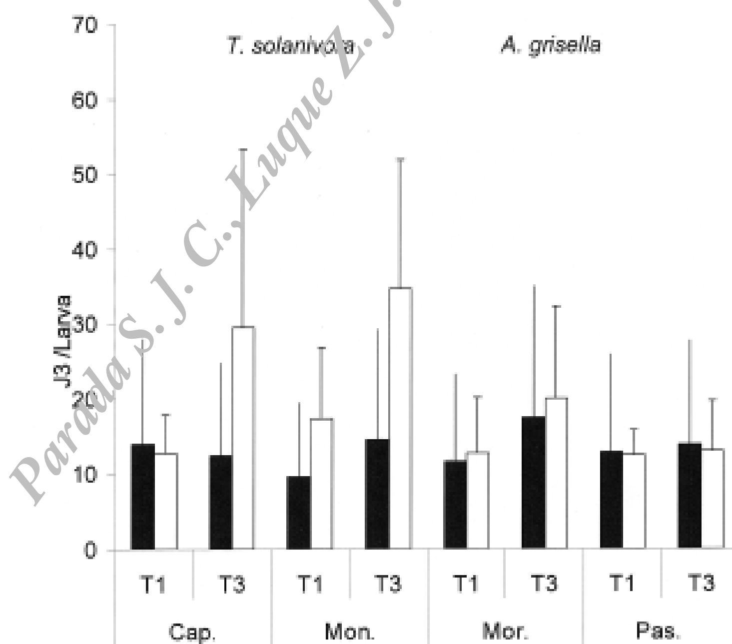


Figura 1. Vial utilizado en la evaluación de los extractos.

Resultados y discusión

Ninguno de los extractos de raíces de las variedades de *S. tuberosum* evaluados afectó el comportamiento ni la capacidad infectiva de los JI sobre los insectos cebo; en éstos se presentó una mortalidad del 95%. Según el análisis de varianza, la mortalidad es altamente significativa para larvas cebo en tratamientos y no para los extractos evaluados,

analizando la interacción de especies por tratamientos, condición acorde con la alta significancia de JI recuperados de larva y suelo en los tratamientos, que mostró la baja acción de los extractos sobre la patogenicidad de los JI. Aunque se presentó una leve diferencia entre la mortalidad y los nematodos recuperados en larvas por tratamiento, esto se debió posiblemente a las variaciones de la calidad del hospedante (Kaya y Koppenhofer, 1996) observada en los cambios de comportamiento y movilidad de las dos especies de larvas, ya que *A. grisella* tendió a movilizarse más por la columna de suelo que *T. solanivora*, posibilitando de este modo una mayor exposición a los JI. En general, los extractos no afectan significativamente la mortalidad de las larvas; sin embargo, se detectó que en T2 (extracto-larva) para *T. solanivora* los extractos de las variedades Monserrate, Morita y Pastusa presentaron rangos de mortalidad entre el 10 y el 50% en Morita (gráfica 1).



Gráfica 1. Efecto de extractos de raíz de *Solanum phureja*, var., Cap. = Capiro; Mon. = Monserrate; Mor. = Morita; Pas. = Pastusa, sobre parasitismo de *S. feltiae* (J3/larva) sobre *T. solanivora* y *A. grisella*. T2 = extracto/larva; T3 = JI/larva/extracto.

Ninguno de los extractos de tubérculos de *S. tuberosum* ejerció un efecto negativo sobre la patogenicidad de los JI de *S. feltiae*. Se presentó variación entre extractos y tratamientos tanto en mortalidad de larvas como en JI recuperados. La incidencia de los extractos sobre la mortalidad de las larvas no fue significativa (p = 0,44), mientras que en nematodos recuperados si fue altamente significativa, determinando que la muerte pudo ser causada por los JI, aunque la alta variación en número de JI recuperados en extractos se debió posiblemente a agregaciones de JI en suelo y a la alta capacidad invasiva dentro de las larvas. Los extractos de Morita y Única para la especie *T. solanivora* y el extracto de Única y Capiro para la especie *A. grisella* presentaron mayor número de nematodos en el T3. Para los demás extractos hay diferencias entre el número de nematodos recuperados pero no entre los tratamientos.

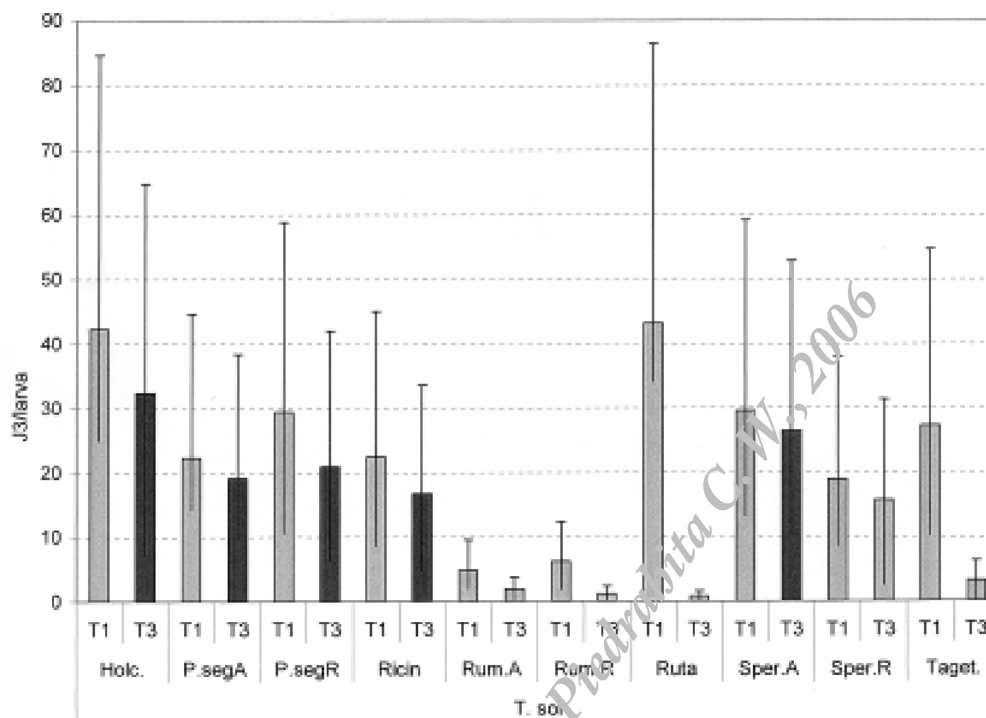
El número promedio de JI recuperados en todos los extractos, por especie, presenta diferencias significativas, siendo mayor en *A. grisella* que en *T. solanivora*. En el tratamiento 2 (larva/extracto) los extractos evaluados causaron entre un 10 y 20% de la mortalidad de las larvas de las dos especies de insectos cebo. Los extractos de tubérculos de papa evaluados no ejercieron efecto negativo sobre la supervivencia de los JI; de todos los extractos se recuperaron JI de suelo (T4). Los extractos de Monserrate y Única presentaron los promedios más bajos y el extracto de Capiro presentó el promedio más alto.

Para el caso en estudio, los extractos de raíces y de tubérculos no causaron un efecto negativo; por el contrario, la planta hospedera de *T. solanivora* presentó un efecto positivo para *S. feltiae* apreciable en el mayor número de nematodos recuperados en el T3, confirmando así que la planta hospedera de la plaga no ejerce un efecto de repelencia hacia los JI como lo sugería Corredor *et al*. (1999) con macerados de raíces de *S. phureja*. Esta repuesta positiva puede darse posiblemente por el favorecimiento o incremento de las señales que estimulan la

búsqueda del hospedante (Hui y Webter, 2000). Aunque los resultados obtenidos no evidenciaron el posible efecto negativo sobre el desarrollo generacional de los nematodos, el encuentro de nematodos adultos dentro de las larvas presentaron indicios de una nueva generación en proceso, ya que metabolitos secundarios de la planta hospedera pueden afectar la virulencia y producción de progenie del nematodo a través de la calidad y sanidad del insecto hospedero (Barbercheck *et al.*, 1995).

En los extractos de malezas evaluados para las dos especies de insectos cebo se observó una disminución en el número de nematodos recuperados en el T3 respecto a los testigos (T1). Esto explica la alta significación entre tratamientos. Los extractos no presentaron diferencias para la mortalidad de las larvas entre especies, pero sí entre tratamientos. Los extractos del área foliar de *Ruta graveolens*, área foliar de *Ricinus comunis* y raíz de *Tagetes zipaquirensis* presentaron un efecto negativo sobre el parasitismo de *S. feltiae,* con una disminución entre el 50 y 100% del número de nematodos recuperados en el T3. Para los extractos de *Rumex crispus* (parte aérea y raíz) se observó que el número de nematodos recuperados en el T1 fue muy bajo, comparado con los testigos de los otros extractos; igualmente se presentó una reducción en el T3 (gráficas 2 y 3).

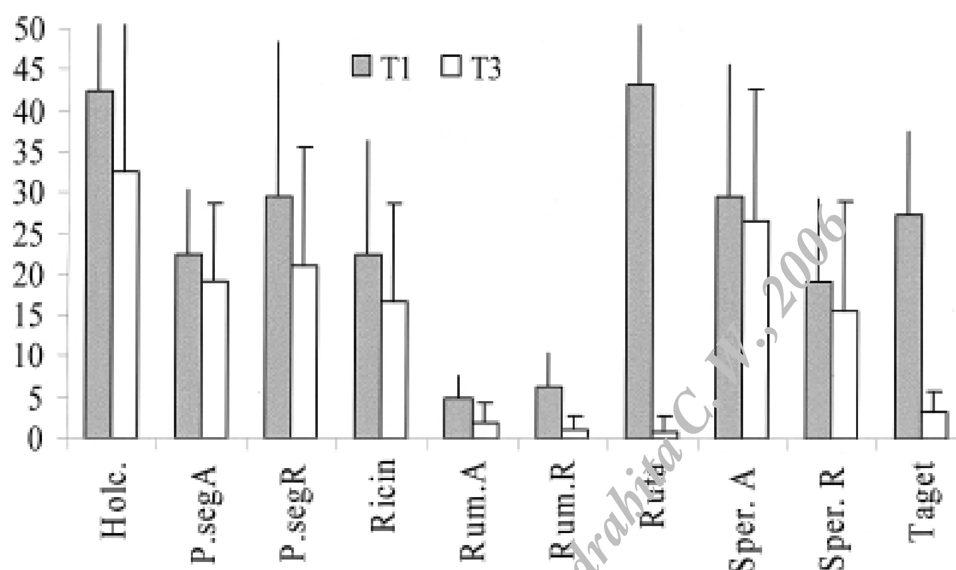
Para *A. grisella* los extractos de *Polygonum segetum* (área foliar y raíz) y *Spergula arvensis* (área foliar) presentaron mayor número de nematodos en el T3; en los demás extractos se presentó una disminución en el T3 respecto del T1. Los extractos de *Rumex crispus* (parte aérea y raíz) presentaron un promedio menor en el número de nematodos recuperados en T1 con relación a los obtenidos en los otros testigos; igualmente, se presentó una disminución en el T3 para las dos especies de insecto cebo, posiblemente debido a problemas de baja patogenicidad presentados por el almacenamiento de los JI durante la realización de este trabajo, aunque con los resultados obtenidos se logra evidenciar que esta planta afecta la patogenicidad de *S. feltiae.*



Gráfica 2. Efecto de extractos de las malezas Holc. (*Holcus lanatus*), PsegA (*Poligonum segetum*, área foliar). PsegR (*Poligonum segetum*, raíz); Ricin (Ricinos comunis); Rum.A (Rumex crispus, área foliar); Rum.R (Rumex crispus, raíz); Ruta (*Ruta graveolens*); Sper.A (*Spergula arvensis*, área foliar); Sper.R (*Spergula arvensis*, raíz); Taget. (*Tagetes zipaquirensis*) sobre parasitismo de *S. feltiae* (J3/larva) afectando T. solanivora, T1 = JI/larva y T3 = JI/extracto/larva

Los extractos de *Ricinus comunis*, *Ruta graveolens*, *Rumex crispus* (raíz) y *Tagetes zipaquirensis* presentaron menor número de JI recuperados del suelo para las dos especies de insectos cebo, siendo el de *Rumex crispus* (raíz) el que menor número de JI presentó, menos del 5 %. Esto confirma que los extractos de estas plantas afectaron la capacidad de penetración mas no la patogenicidad ni supervivencia de los JI de *S. feltiae*.

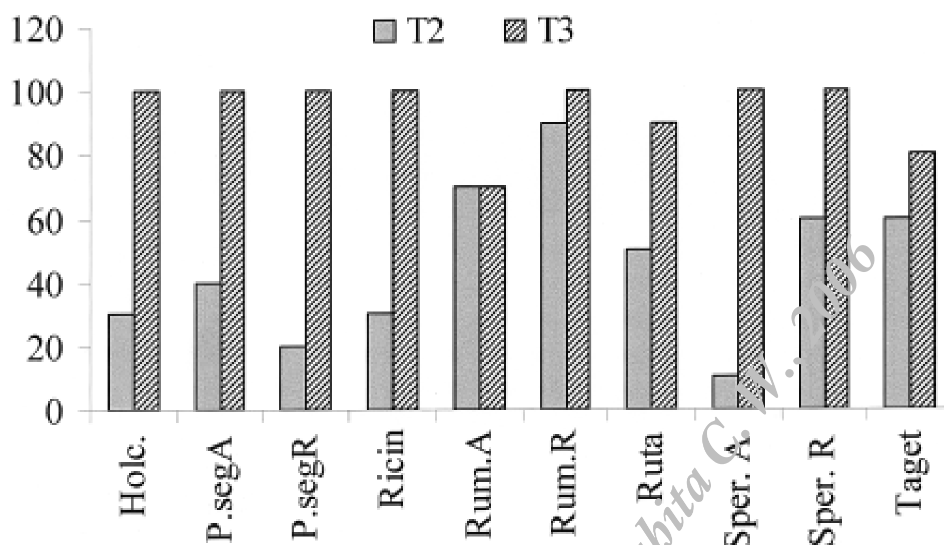
Los extractos de *Tagetes zipaquirensis* han sido reportados con acción nematicida sobre larvas y huevos de *Meloidogyne incognita*, en exposición directa al extracto (Camelo, 1994); sin embargo, para los



Gráfica 3. Porcentaje de parasitismo de *S. feltiae* sobre *A. grisella*, expuestos a extractos de las malezas. Holc. (*Holcus lanatus*), P.segA (*Poligonum segetum*, área foliar). P.segR (*Poligonum segetum*, raíz); Ricin (*Ricinus comunis*); Rum.A (*Rumex crispus*, área foliar); Rum.R (*Rumex crispus*, raíz); Ruta (*Ruta graveolens*); Sper.A (*Spergula arvensis*, área foliar); Sper.R (*Spergula arvensis*, raíz); Taget. (*Tagetes zipaquirensis*).T1 = JI/larva, T3 = JI/extracto/larva.

JI de *S. feltiae* no se presentó tal efecto. De la misma forma, componentes como el Terthienyl, que está presente en varias especies de la familia Compositae, presentan un efecto letal en concentraciones directas y en arena sobre *S. glaseri*, efecto que no ocurre en soluciones acuosas de este mismo componente (Kanagy y Kaya, 1996). Esta es la posible explicación para el efecto de *T. zipaquirensis*, que pertenece a esta familia y que posiblemente posea un componente nocivo para los nematodos; efectos similares pueden atribuirse a *R. graveolens*.

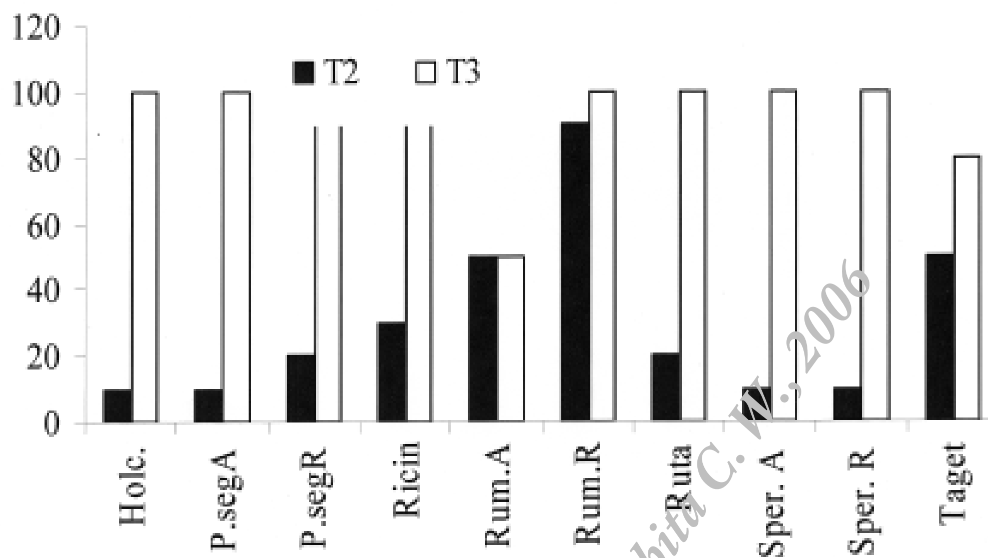
En observaciones de laboratorio, se detectó que al alimentar las larvas de *Spodoptera* spp. con foliolos de *R. comunis*, la patogenicidad de *S. feltiae* disminuyó hasta en un 100%, condición que se mantuvo al



Gráfica 4. Porcentaje de parasitismo de *S. feltiae* sobre *T. solanivora*. T2 = extracto/larva y T3 = JI/extracto/larva. Holc. (*Holcus lanatus*), PsegA (*Poligonum segetum*, área foliar). PsegR (*Poligonum segetum*, raíz); Ricin (*Ricinus comunis*); Rum.A (*Rumex crispus*, área foliar); Rum.R (*Rumex crispus*, raíz); Ruta (*Ruta graveolens*); Sper.A (*Spergula arvensis*, área foliar); Sper.R (*Spergula arvensis*, raíz); Taget. (*Tagetes zipaquirensis*). T2 = extracto/larva y T3 = JI/extracto/larva.

analizar los extractos de esta planta, o sea que el efecto se debe a metabolitos de la planta mas no transformaciones por digestión en los insectos, como en un comienzo de había supuesto.

Las larvas de *T. solanivora* fueron más susceptibles a los extractos evaluados, presentando los mayores porcentajes de mortalidad. El extracto que menos afectó las larvas de *T. solanivora* fue el de *Spergula arvensis,* presentando sólo un 10% de mortalidad; el mayor efecto lo presentó el extracto de *Rumex crispus* (raíz) con un 90% de mortalidad en el T2 (gráfica 4). Todos los extractos mostraron efecto sobre la mortalidad de las larvas de *A. grisella*, siendo el de *Rumex crispus* (raíz) el que registró mayor mortalidad, con 90% en el T2, seguido del *Tagetes zipaquirensis* y *Rumex crispus* (raíz), con 50% de mortalidad en el T2 (gráfica 5).



Gráfica 5. Porcentaje de parasitismo de *S. feltiae* sobre *A. grosella*, expuestos a extractos de las malezas Holc. (*Holcus lanatus*), P.segA (*Poligonum segetum*, área foliar). P.segR (*Poligonum segetum*, raíz); Ricin (*Ricinus comunis*); Rum.A (*Rumex crispus*, área foliar); Rum.R (*Rumex crispus*, raíz); Ruta (*Ruta graveolens*); Sper.A (*Spergula arvensis*, área foliar); Sper.R (*Spergula arvensis*, raíz); Taget. (*Tagetes zipaquirensis*). T2 = extracto/larva y T3 = JI/extracto/larva.

Referencias

BARBERCHECK, M.; WANG, J.; HIRSH, I. 1995. Host Plant Effects on Entomopathogenic Nematodes. Journal of Invertebrate Pathology 66: 169-177.

CAMELO, A. 1994. Estandarización de las condiciones óptimas para el cultivo de fitonematodos y determinación de la posible actividad nematicida de un extracto de *Tagetes zipaquirensis*. Tesis. Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia.

CORREDOR, T.; PALACIOS, L.; PARADA, J. 1999. Capacidad de búsqueda de *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) sobre *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) afectando *Solanum phureja*, en laboratorio. EN: Resúmenes XXVI Congreso sociedad Colombiana de Entomología. Santafe de Bogotá.

GAUGLER, H. 1999. Matching Nematode and Insect to Achieve Optimal Field Performance. EN: Optimal use of insecticidal Nematodes in pest Management. Ed. Sridhar Polavarapu, Rutgers University. New Brunswick, New Jersey, USA, pp. 9-14.

HUI, E.; WEBSTER, M. 2000. Influence of insect larvae and seedling roots on the host –finding ability of *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) Journal of invertebrate Pathology 75, pp. 152-162.

KANAGY, J.; KAYA, H.K. 1996. The possible role of Marigold roots and ?-terthienyl in mediating host–finding by Steinernamatid nematodes. EN: Nematologica, 42, pp. 220-231.

KAYA, H.; KOPPENHOFER, A. 1996. Effects of Mycrobial and other Antagonistic Organism y Competition on Entomopathogenic nematodes. Biocontrol Science and Technology 6, pp. 357-371.

TIMPER, P.; KAYA, H.; JAFFEE, B. 1991. Survival of entomogenous nematodes in soil infested whit the nematode-parasitic Fungus *Hirsutella rhossiliensis* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Biological control 1, pp. 42-50.

TIMPER, P.; BRODIE, B. 1993. Infection of Pratylenchus penetrans by Nematode- pathogenic Fungi. Journal of Nematology 25 :2, pp. 297-302.

ZUCKERMAN, B.; MAI, W. 1990. Plant Nematology, Laboratory Manual, Eds. Agricultural Experiment Station U. of Massachusets, Amherst, Mass, pp. 10-26.

Patogenicidad de doce especies de hongos sobre JI de *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae), cepa Colombia

Palacios N.[*], Luque J. E.[**] y Parada J. C.[***]

Resumen

Se determinó el efecto de los hongos *Zigorhnchus heterogamus*, *Mucoral* sp., *Fusarium* sp1., *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp2., *Verticillium lecanii*, *Paecilomyces lilacinus*, *P. fumosoroseaus*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Arthrobotrys* sp., y *Gliocladium* sp. sobre juveniles infectivos de *Steinernema feltiae*, cepa Colombia. Estos hongos fueron aislados de suelos cultivados con papa, en los municipios de Usme y Subachoque (Cundinamarca). Los montajes se llevaron a cabo en cajas de Petri de cuadrantes láminas tipo Cobb. Se evalúo el comportamiento de los JI de acuerdo con las recomendaciones de Ishibashi & Takii (1993). Los JI fueron más activos durante las primeras 24 horas de exposición a los hongos, un promedio del 15% se adentró al área de crecimiento hifal y el 85% restante se ubicó en áreas anexas sobre el medio o alrededor de la caja de Petri. Pasadas las 36 horas, los JI mostraron comportamientos de relajación, con sus cuerpos completamente estirados o enroscados, solitarios, dentro de las áreas de crecimiento hifal y agrupados sobre el agar o en las paredes de las cajas de Petri. Sólo las especies *Fusarium* sp1, *M. anisoplae*, *Gliocladium* sp., *Arthrobotrys* sp., *P. lilacinus* y *P. fumosoroseaus* causaron patologías de muerte sobre los JI, al ser capturados por los anillos hifales

Palabras clave: *Steinernema feltiae*, hongos del suelo, hongos entomopatógenos.

---

[*] Ingeniera Agrónoma, instructora SENA. Regional Meta
[**] luqsan@cablecentro.net.co
[***] insectsyco@icqmail.com

Introducción

Nematodos entomoparásitos como *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) de amplia distribución y parásitos obligados de insectos del suelo, vienen siendo usados como agentes controladores de plagas dentro de varios cultivos a nivel mundial (Kaya & Gaugler, 1993). Sin embargo, su eficacia en el control está determinada por factores abióticos y bióticos propios del ambiente suelo (Kaya & Koppenhofer, 1996). De los diferentes organismos presentes en suelo, los hongos pueden actuar de manera sinérgica con nematodos entomoparásitos sobre plagas del suelo o como competidores por espacio y potenciales hospederos (Smith, 1999), pero de igual manera pueden afectarlos patológicamente (Koppenhofer *et al*, 1996).

Metodología

A partir de muestras de suelo de la sabana, provenientes de cultivos de papa y usando la técnica de diluciones seriadas, se aislaron, identificaron y evaluaron las especies de hongos: *Zigorhnchus heterogamus*, *Mucoral* sp., y *Fusarium* sp1., *Rhizopus* sp., y *Fusarium* sp2., *Verticillium lecanii*, *Paecilomyces lilacinus*, *P. fumosoroseaus*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisoplae*, *Arthrobotrys* sp., y *Gliocladium* sp., identificadas gracias a la asesoría de la doctora Rosmira Rivero, de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional. Para la evaluación de los hongos se siguieron las técnicas recomendadas por Kaya y Koppenhofer (1996), las cuales consisten en exponer los nematodos a hongos en cajas de Petri y en suelo.

Hongos en cajas de Petri

Se emplearon cajas de cuadrantes con siembras de los hongos *Z. heterogamus* , *Mucoral* sp, *Fusarium* sp 1, *Rhizopus* sp. y *Fusarium* sp 2, *V. lecanii*, *B*. *bassiana M*. *anisopliae* y *Gliocladium* sp en PDA, dependiendo del crecimiento de los hongos. Entre las 24 y 36 horas de

crecimiento hifal y se liberaron 50 JI/12 µl. Cada 12 horas, durante 4 días, se realizaron observaciones evaluando el comportamiento de los JI respecto a la movilidad dentro y fuera del hongo, patologías y supervivencia. Para verificar patologías y supervivencia de los JI, se aislaron y se realizaron tinciones y observaciones al microscopio. El montaje para cada hongo se realizó en 10 cajas (repeticiones) y como testigos se utilizó una caja con sólo nematodos y otra con sólo el hongo.

Para el montaje de los hongos *Arthrobotrys* sp, *P. fumosoroseus*, y *P. lilacinus* se usaron cajas de Petri de 5 cm y siembra en agar de harina de maíz (CMA) (50g de harina de maíz; 10 g de agar; 800 ml de ADE). Se incubó durante 7 días a una temperatura promedio de 22 °C. Transcurrido este tiempo se liberaron 100 JI/50 µl por caja. Posteriormente se realizaron observaciones evaluando el comportamiento, patologías y supervivencia. Al igual que para el montaje anterior, se aislaron y realizaron tinciones y observaciones al microscopio para verificar patologías y supervivencia del JI. Se montaron 10 repeticiones con dos testigos, uno para los nematodos y otro para el hongo.

Hongos en suelo

De acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación anterior, los hongos que presentaron patogenicidad sobre *S. feltiae,* cepa Colombia, se evaluaron en suelo en concentraciones de 1x10^6 esporas/ml sobre 2 g de suelo pasteurizado en cajas de cultivo de 12 cavidades. Pasados 7 días se liberaron entre 50 y 200 JI/ml, disponiendo los siguientes tratamientos, cada uno con tres repeticiones:

T1: Hongo + 50 JI	T5: No hongo + 50JI (testigo)
T2: Hongo + 100 JI	T6: No hongo + 100JI (testigo)
T3: Hongo + 200JI	T7: No hongo + 200JI (testigo)
T4: Hongo + 0 JI	T8: No hongo + 0 JI (Testigo)

Los tratamientos 5, 6, 7 y 8 se tomaron como testigos para cada concentración de JI. Pasados 7 días de liberados los JI, se dispuso una larva de cuarto instar de *T. solanivora* por cada repetición. Luego de 72 horas se determinó la mortalidad de la larva y por medio de disecciones de éstas se contabilizaron el número de nematodos que habían ingresado; una vez realizadas las evaluaciones se depositaron de nuevo larvas por repetición. El proceso de liberación de larvas se realizó cada 7 días hasta no encontrar nematodos dentro de éstas.

Resultados y discusión

Hongos en cajas de petri

En total se evaluaron 12 especies de hongos aislados de muestras de suelo y de reconocida acción entomopatógena. En la tabla 1 se registraron las especies de hongos y su efecto sobre los JI. Las siguientes especies evaluadas no ejercieron ningún efecto nocivo o deletéreo sobre los juveniles infectivos: *Z. heterogamus*, *Mucoral* sp, *Fusarium* sp 1, *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp 2, *V. lecanii*, *Gliocladium* sp., *B. bassiana* y *M. anisopliae.* Únicamente las especies *P. lilacinus*, *P. fumosoroseus* y *Arthrobotrys* sp. causaron patogenicidad sobre los JI, tanto aquellos expuestos en cajas de petri como en ensayos en suelo.

Para las especies *Z. heterogamus*, *Mucoral* sp, *Rhizopus* sp, *Fusarium* sp2, *Gliocladium* sp y *M. anisopliae* se observó a las 12 horas JI moviéndose dentro de la zona de crecimiento del hongo, a las 24 horas aumentó el número de JI dentro del hongo, entre las 36 y 48 horas los movimientos observados eran más lentos y algunos JI tomaban una posición enrollada sobre sí mismos entre el agar y el hongo. En ninguno de estos casos se evidenció patogenicidad sobre los JI. Para la especie *Fusarium* sp1, aislada de suelo del invernadero, sólo se observó el ingreso de un JI dentro de la zona del hongo 72 horas después de liberados los JI.

Tabla 1. Efecto de 12 cepas de hongos sobre los JI de *S. feltiae*

Hongos evaluados	Movilidad	JI muertos	Atrapamiento
Zigorhunchus heterogamus	+	-	-
Mucoral sp	+	-	-
Fusarium sp 1	+	+	-
Rizopus sp	+	-	-
Fusarium sp 2	-	-	-
Verticillium lecanii	+	-	-
Paecilomyces lilacinus	+	+	+
Paecilomyces fumosoroseus	+	+	+
Beauveria bassiana	+	-	-
Metarrizium anisopliae	+	+	-
Arthrobotrys sp	+	+	+
Gliocladium sp	+	+	-

Se encontraron algunas particularidades en algunos hongos, como en la especie *Mucoral* sp. en la que se apreciaron JI subiendo por las hifas y al llegar a la punta se apoyaron y estiraron hasta alcanzar otra hifa para así poder desplazarse entre ellas. El género *Gliocladium* sp. es patogénico sobre nematodos parásitos de plantas, pero para *S. feltiae* no resultó patogénico, aunque se observó hacia las 72 horas JI desplazándose por entre las hifas del hongo con movimientos lentos y dificultosos, y la formación de anillos hifales rodeando los JI, pero el movimiento de éstos permitía que se liberaran fácilmente de los anillos.

Para *M. anisopliae* en las zonas donde el hongo tuvo una alta esporulación, los movimientos de los JI fueron bruscos y dificultosos pero lograban desplazarse entre las hifas; se encontraron JI totalmente cubiertos de esporas, pero con sus movimientos lograban despegarlas. No se encontraron esporas germinadas dentro de los cuerpos de los JI. En el caso de *B. bassiana,* sólo hasta 36 horas después de liberados los JI se observaron movimientos dentro de la zona de crecimiento del hongo; pasadas 48 horas no se evidenció movimiento ni dentro ni fuera del hongo; todos los JI tomaron una posición de enrollamiento

como si el medio produjera un metabolito o un ambiente que no era agradable para ellos.

En el hongo *V. lecanii* se observaron algunos JI desplazándose dentro de la zona de crecimiento del hongo a las 24 horas, pero debido al crecimiento del mismo no se pudo continuar con las observaciones porque no se diferenciaban los JI. Por tal motivo el montaje se repitió en cajas de Petri pequeñas, usando CMA como medio de cultivo. A pesar de que en este medio el crecimiento es menos denso tampoco se logró diferenciar los JI dentro del hongo. El medio CMA ha sido reportado por muchos autores en la evaluación de hongos con diferentes especies de nematodos (Persson y Jansson, 1999), Gronvold *et al.*, (1988); los resultados obtenidos permitieron confirmar que este medio facilita la observación y no afecta la patogenicidad del hongo.

Las especies de *Arthrobotrys* spp. son consideradas como un buen predador de nematodos parásitos de plantas Cayrol *et al.*, 1978 (citado por González *et al*, 1988), Koppenhofer *et al*, 1996, Persson y Jansson, 1999. En el presente estudio se confirmó este efecto predador sobre JI de *S. feltiae,* cepa Colombia, en cajas de agar, siendo éste el hongo más patogénico que se encontró. Esta especie tiende a formar redes para atrapar a los nematodos, lo que hace presumir que la cepa evaluada posiblemente era de *A. robusta,* ya que no produjo anillos constrictores tan fuertes como en otras especies de *Arthrobotrys* sp. (Timper y Brodie, 1993).

Hongos en suelo

Las cepas de los hongos *Arthrobotrys* sp, *P. lilacinus*, *P. fumosoroseus* que presentaron efecto sobre los JI de *S. feltiae,* cepa Colombia, en cajas de petri con agar también afectaron la supervivencia y capacidad de ingreso de los JI de *S. feltiae* bajo condiciones de suelo sobre larvas de *T. solanivora*. Se encontraron diferencias significativas entre el número de nematodos recuperados en las larvas a través del tiempo,

en presencia del hongo y entre las dosis de JI expuestos, pero no entre las cepas de hongos evaluadas.

Los mayores porcentajes de recuperación se presentaron en la primera larva expuesta (7 días después de aplicación DDA), evidenciándose el efecto de los hongos con el menor número de JI recuperados en los tratamientos respecto de los testigos, para los tres hongos evaluados.

En todos los casos, se evidenció una disminución en el número de nematodos recuperados a través del tiempo, lo que se debe a que sólo al iniciar el ensayo se liberaron JI y cada larva iba extrayendo lo que quedaba de la anterior. Por tal razón se aprecia más el efecto en la primera larva. Para el hongo *P. fumosoroseus* se presentó un porcentaje alto de recuperación en la larva 2 (DDA14) a la dosis 200, posiblemente algunos JI escaparon al hongo y lograron localizar un hospedero e ingresar y causar la muerte del mismo.

El mayor porcentaje de JI recuperados lo presentó el hongo *P. lilacinus*. Los resultados mostraron que a mayor población de JI se presenta una menor incidencia del efecto de los hongos; algunos JI fueron atrapados pero otros lograron localizar e infectar su hospedero.

Los hongos y los JI causaron una mortalidad de las larvas entre el 30 y 100%, presentándose los mayores porcentajes para *P. lilacinus* y *P. fumosoroseus*. Así mismo, los mayores porcentajes de mortalidad se evidenciaron en las dosis más altas, lo que demostró que la mortalidad pudo haber sido causada por los nematodos.

Aunque un sólo nematodo ingrese a la larva, causa la muerte de la misma, mostrando que estos hongos afectan a los JI porque los atrapan y no por efectos sobre su patogenicidad.

Referencias

GONZÁLEZ, M.C.; MENDOZA, P.; QUIROZ, R. 1998. Comparison of the trapping ability of *Arthrobotrys robusta* and *Monacrosporium gephyropagum* on infective larvae of *Strongyloides papillosus*. Journal of Helminthology 72. pp. 209-213.

GRONVOLD, J.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, A.; THYLIN, J.; WOLSTRUP, J. 1988. The capability of the predacious fungus *Arthrobotrys oligospora* (Hyphomycetales) to reduce numbers of infective larvae of *Ostertagia ostertagi* (Trichostrongylidae) in cow pats and herbage during the grazing season in Denmark. Journal of Helminthology 62. pp. 271-280.

KAYA, H.K.; GAUGLER, R. 1993. Entomopathogenic Nematodes. Annual Rev. Entomol., 38, 181-206.

KAYA, H.K.; KOPPENHOFER, A.M. 1996. Effects of microbial and the antagonistic organism and competition on Entomopathogenic nematodes. BioControl Science and Technology 6, 367-371.

KOPPENHOFER, A.M.; JAFFE, B.A.; MULDOON, E.; STRONG, R.D.; KAYA, H.K. 1996. Effect of nematode-Trapping Fungi on an Entomopathogenic Nematode Originating from the Same Field Site in California. Journal of Invertebrate Pathology 68, 246-252.

PERSSON, C.; JANSSON, H. 1999. Rhizosphere colonization and control of *Meloidogyne* spp. by nematode –trapping fungi. Journal of Nematology 31:2 pp. 164-171.

SMITH, K. 1999. Factors Affecting Efficacy, En Optimal use of insecticidal nematodes in pest management. Ed. S. Palavarapu , pp 37-46, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey.

TIMPER, P.; BRODIE, B. 1993. Infection of *Pratylenchus penetrans* by Nematode- pathogenic Fungi. Journal of Nematology 25:2. pp. 297-302.

Proceso de infección de *Steinernema feltiae* cepa Colombia, sobre larvas de *Tecia solanivora*

Corredor L. T.*, Luque J. E.** y Parada J. C.***

Resumen

A fin de conocer el comportamiento de parasitismo de juveniles infectivos de *Steinernema feltiae* sobre estados larvales de *Tecia solanivora* (insectos de hábitat críptico) se establecieron ensayos de penetración, de tiempo de exposición, de columna de arena variando humedad y textura de suelo, y ensayos uno a uno. Los juveniles infectivos mostraron que a un 18% de penetración se reporta 100% de mortalidad a las 12 horas, se presenta alta movilidad en suelos de textura arenosa, franco arenosa, franco limosa y franco arcillosa, siempre y cuando su humedad no supere la capacidad de campo. En suelos de texturas arcillosa y limosa la movilidad disminuye si la humedad varía de seco o saturado. La capacidad de localización y penetración de los JI a las larvas de *T. solanivora*, en galerías formadas dentro los tubérculos por las larvas, no se ve afectada por la profundidad de localización del tubérculo, ni por la disposición de las galerías en este. Estos localizan el tubérculo en el suelo y llegan a la larva que se encuentra dentro de la galería del tubérculo, independientemente del tipo de suelo y profundidad. *S. feltiae* se muestra como un posible controlador de especies de insectos de hábitat críptico.

Palabras clave: nematodos entomoparásitos, *Steinernema feltiae, Tecia solanivora*.

---

* Ingeniera Agrónoma, candidata a M.Sc., suelos y aguas, Escuela de Postgrado, Facultad de Agronomía U. N., Bogota D.C
** luqsan@cablecentro.net.co
*** insectsyco@icqmail.com

Introducción

El registro de especies nativas de nematodos entomoparásitos de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* en Colombia ha incrementado el interés de investigación sobre estos organismos como controladores de insectos de importancia económica en diferentes cultivos. La especie *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) aislada en áreas productoras de papa, *Solanum tuberosum*, en Cundinamarca y Boyacá (Sáenz, 1998; Parada, 2001) es la que se proyecta como posible alternativa de control biológico para plagas en cultivos inmediatos en bosques alto andinos y páramos.

Experiencias como las de Garzón y Aza (1994), Alvarado *et al* (1998), Sáenz (1998) y Corredor (2001) han proporcionado información biológica, ecológica y de parasitismo sobre diferentes hospedantes, registrando hasta un 99% de mortalidad en larvas de último instar de *Clavipalpus ursinus* (Sáenz, 1998), *T. solanivora* (Parada, 2001; Alvarado *et al.,* 1998, Corredor 1999) y *Achroia grisella* (Corredor, 2001; Parada, 2001).

El proceso de infección de los juveniles infectivos de *S. feltiae* permitió medir la habilidad del nematodo para buscar, reconocer, penetrar y matar al hospedante blanco, además de determinar su sensibilidad. Los experimentos comprendieron ensayos de virulencia y sensibilidad, los cuales, siguiendo el proceso completo de infección, permitieron determinar el parasitismo del nematodo y la sensibilidad del hospedante al medir respectivamente la tasa de penetración de juveniles infectivos y el tiempo de muerte del blanco (Caroli *et al.*, 1996). Por otro lado, ensayos de columna de arena permiten conocer la movilidad y la capacidad de búsqueda de los juveniles infectivos, al medir la tasa de penetración y el desarrollo del nematodo en hospedantes de comportamiento críptico o libremente localizados en suelos con textura, humedad y profundidad diferentes.

Materiales y métodos

Las poblaciones de larvas y nematodos se obtuvieron de las crías del laboratorio de control biológico de entomología (Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá), mantenidas a 24 ±1 °C de temperatura y humedad relativa de 60%. Se usaron larvas de último instar de *Galleria mellonella* (L), *Achriolla grisella* (Fabricius,1794), (Lepidoptera: Pyralidae) de primer y último instar; además, se emplearon pupas de *Tecia solanivora*. Como material vegetal se usaron tubérculos de *Solanum phureja* variedad yema de huevo. Los juveniles infectivos (JI) de *S. feltiae* se incrementaron siguiendo las recomendaciones de Stock, 1998, a partir de reinoculaciones con larvas de *G. mellonella* sobre cajas de Petri con 5 x 10^6 nematodos almacenados en 50 g de arena de río estéril.

Prueba de Virulencia y Sensibilidad

Se dispusieron 50, 100 y 150 JI/ml/orificio en cajas de cultivo de tejido tipo Falcon® de 12 orificios, con papel filtro y arena de río estéril. Transcurridas 24 horas, se expusieron por concentración larvas de *T. solanivora* de primero y cuarto instar, y pupas. A las 12, 48, 72 y 96 horas se evaluó el porcentaje de mortalidad en larvas y, por disección, se determinó el porcentaje de penetración de nematodos por hospedante.

El ensayo siguió un diseño completamente al azar con factorial 3 x 4 x 3 x 15, correspondiente a tres concentraciones de JI, cuatro tiempos, tres estados larvales y 15 réplicas.

Pruebas en columna de arena

Para estos ensayos se utilizaron suelos de texturas franco arcillosa (FAr), franco arenosa (FA), franco limosa (FL) y arena de río (A), debidamente pasteurizados ocho días antes de cada montaje. Las pruebas comprendieron:

Movilidad en columna de suelo. En cilindros plásticos de 25 cm de largo, 2,5 cm de diámetro, con dos orificios laterales distanciados 7 cm cada uno, y una capacidad de 110 g, se dispusieron tratamientos para determinar la movilidad y capacidad de búsqueda de JI de *S. feltiae* sobre larvas de *T. solanivora* libres en suelo a 24 cm de profundidad. Para las texturas de suelo, se evaluaron las humedades de capacidad de campo (36%), seco (1%) y saturado (56%). Para cada una de las repeticiones, las larvas se dispusieron a 24 cm de profundidad y se aplicaron 400 nematodos en la superficie del suelo de cada cilindro, dispuestos verticalmente (figura 1). Las evaluaciones se realizaron sobre muestras de suelo extraídas a través de los orificios laterales de cada cilindro, a las 12, 24, 48 y 72 horas. Las muestras de suelo fueron centrifugadas a 300 rpm por dos minutos, contando el número de nematodos presentes en cada muestra. A las 72 horas se determinó la muerte de las larvas y se disectaron para verificar la presencia o ausencia de nematodos y su estado de desarrollo. El ensayo siguió un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4 x 3 x 4 x 5, correspondiente a cuatro texturas, tres humedades, cuatro tiempos y cinco réplicas (figura 1).

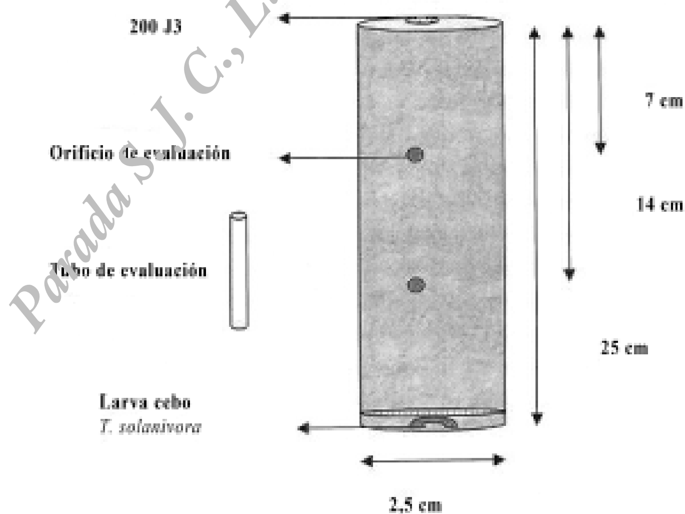


Figura 1. Cilindro para pruebas de movilidad y penetración de JI *S. feltiae* en tres texturas y tres humedades de suelo.

Capacidad de búsqueda 1. En recipientes plásticos con 1.500 g de suelo de textura FL se dispusieron 2 tubérculos de *S. phureja* a 9 y 19 cm de profundidad, expuestos a 200 huevos de *T. solanivora* listos para eclosionar (figura 2). A fin de determinar la capacidad de búsqueda y el ataque de los JI sobre los estados larvales de *T. solanivora* libres en suelo y dentro de los tubérculo, se procedió a liberar 15.000 JI en repeticiones diferentes, a los cinco días después del montaje 5 DDM, 10 DDM, 15 DDM, 20 DDM y 25 DDM, a los cuales se les denominó respectivamente T1, T2, T3, T4 y T5. El ensayo siguió un DCA con tres réplicas por tratamiento. El avance del ataque de *T. solanivora* sobre el tubérculo se consideró como el tratamiento absoluto del ensayo. Pasados 25 días de la liberación de los JI en cada tratamiento, se evaluó el porcentaje de daño en tubérculos por medio de la clave de daño modificada sugerida por Rodríguez (1988): número de nematodos presentes en suelo por medio de las técnicas de embudos Baermann y presencia de nematodos en galerías de tubérculo, larvas y pupas. La valoración de la capacidad de búsqueda de los JI se estableció por los niveles de daño en tubérculos y presencia o ausencia del nematodo en tubérculos, larvas o pupas.

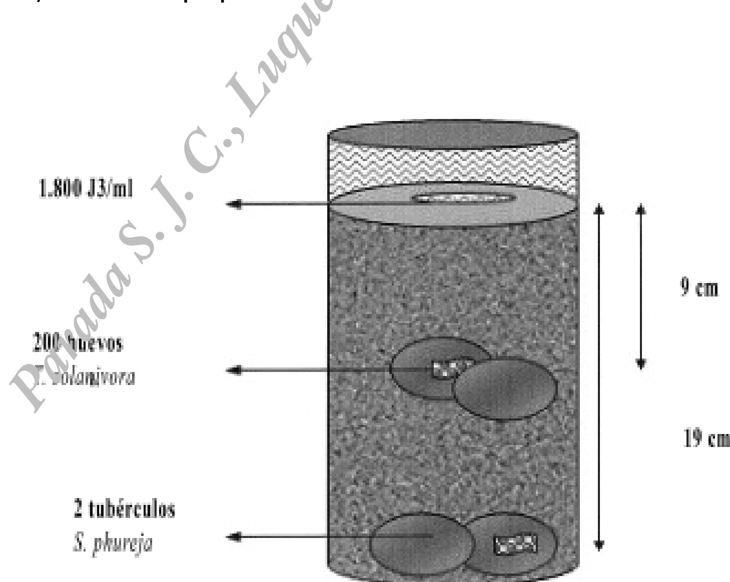


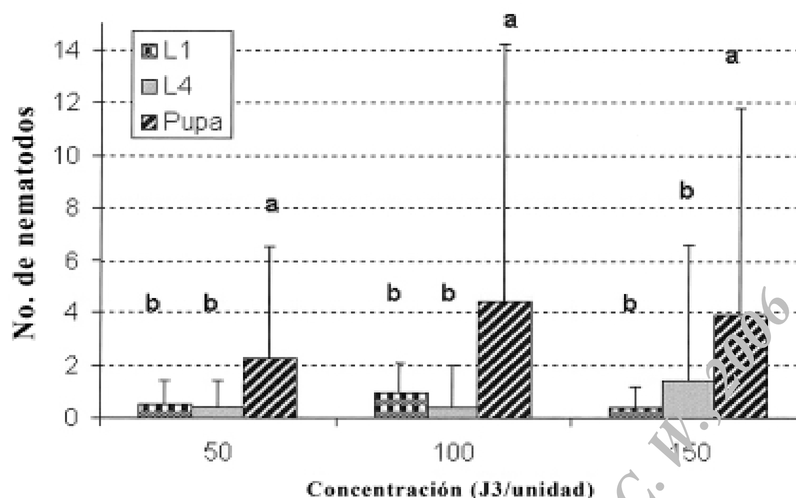
Figura 2. Montaje para pruebas de capacidad de búsqueda de JI *S. feltiae* sobre *T. solanivora* en tubérculos, a dos profundidades de siembra en suelo.

Capacidad de búsqueda 2. Se dispusieron 2 tubérculos de *S. phureja* a 15 cm de profundidad, en bolsas con 3 kg de suelo de textura FL, discriminando bolsas con suelo pasteurizado y sin pasteurizar (natural). Todas las bolsas se fertilizaron con 5g/bolsa del fertilizante grado NPK 10-30-10. Por bolsa se liberaron 200 huevos de *T. solanivora* en la superficie del suelo y 45.000 JI/ repetición. El ensayo siguió un diseño completo al azar con arreglo factorial 2 x 2 x 7, correspondiente a dos tipos de suelo (pasteurizado y natural), dos tratamientos, T1 a los 5 DDM y T2 a los 20 DDM. Se contó un testigo relativo (TR) con huevos y sin JI, y un testigo absoluto (TAB) (sin huevos ni JI); cada tratamiento contó con dos repeticiones. A los 25 DDL de JI se evaluó el porcentaje de daño en tubérculos, el número y parasitismo de nematodos presentes en suelo y la presencia de nematodos en tubérculos, larvas y pupas.

Resultados y discusión

Prueba de virulencia y sensibilidad

Ensayos uno a uno, tiempo de exposición y capacidad de penetración. Para *T. solanivora* en las tres concentraciones no se encontraron diferencias significativas en la penetración de JI a los diferentes estados de desarrollo, aunque para el modelo se encontraron diferencias significativas (F = 4,69 *gl* = 35 Prob > F = <0,0001) y se encontraron diferencias para estado de desarrollo y para la interacción entre tiempo y estados de desarrollo. En cuanto a las concentraciones no hubo diferencias significativas con respecto al número de nematodos que penetraron. Al realizar la prueba de comparación de Tukey se encontró que en el estado de desarrollo de pupa se presentó el mayor número de ingreso de JI con respecto a los otros estados de desarrollo (gráfica 1). En la prueba de contrastes se confirman las diferencias para estado de desarrollo y para la interacción entre tiempo y estados de desarrollo. Se encontró que la capacidad de penetración (P:%) 0 para los estados de desarrollo de *T. solanivora* es bastante baja, aunque para cada



Gráfica 1. Número de nematodos que ingresan a diferentes estados de desarrollo de *T. solanivora*. (Promedios seguidos por la misma letra no son significantemente diferentes a a = 0,05, prueba de Tukey).

estado hay un máximo de penetración de JI (tabla 1). Para el primer instar penetra un máximo de 2 JI por larva, mientras que para larvas de cuarto instar se halló un máximo de 56 JI por larva y un mínimo de 1 JI; en pupas se encontró un máximo de 32 JI por pupa y un mínimo de 1 JI, con un rango de mortalidad entre el 68,75 y el 93,75%. Cuando se infectaron en suelo larvas de *T. solanivora*, se encontró 18,55% de penetración de JI, con un mínimo de 1 JI y un máximo de 73 JI en larvas muertas, con 93,75% de mortalidad.

Tabla 1. Porcentaje de penetración (%P) de JI de *S. feltiae* en tres concentraciones y de mortalidad (%M) de tres estados de desarrollo de *T. solanivora.*

Estado de desarrollo	JI/ml	Arena	
		%P	%M
I instar T. solanivora	50	2.4	93.75
	100	1.27	75
	150	0.58	81.9
IV instar T. solanivora	50	1.47	75
	100	18.5	93.75
	150	2.62	93.75
Pupa T. solanivora	50	3.87	68.75
	100	2.73	75
	150	1.47	93.75

Para larvas de *G. mellonella* en arena existe un porcentaje de penetración de 76%, con una mortalidad del 100%, y para *A. grisella* en arena un 36% con un 100% de mortalidad en arena y en suelo 24,58% de penetración y mortalidad del 93%. Para todos los insectos, el tiempo de exposición coincidió con que el 93% de los insectos ya estaban muertos a las 12 horas.

Se observó que el nematodo penetra larvas de primer instar de *T. solanivora* dado que su tamaño aproximado está entre 1,3 a 1,4 mm (Herrera, 1997), alcanzando a encontrar machos y hembras de primera generación. En los tres estados larvales de *T. solanivora* se observaron muy pocos nematodos que ingresaron a las larvas o pupas, pero aquellos que ingresaron mostraron alto parasitismo, causando la muerte al hospedante. En estado de pupa se encontró el mayor ingreso de JI a las 12 horas, mientras que en los otros estados se encontró a las 72 horas y la relación de penetración con respecto a la concentración es directa, porque a medida que aumenta la concentración aumenta el número de JI que ingresa al hospedante. Algo muy similar sucede con *S. carpocapsae* cuando entre las 48 y 72 horas se presenta el mayor número de nematodos dentro del insecto trampa (Epsky y Capinera, 1993). Las diferencias en invasión por parte del nematodo con respecto a las diferentes especies de insectos y sus estados de desarrollo se puede deber, como lo afirma Westerman (1998), a la actividad, la cutícula, el tamaño u otros aspectos del insecto.

S. feltiae muestra una mortalidad hasta del 93%, comparada con la que muestran Epsky y Capinera (1994) al nombrar datos de 73% de mortalidad con una penetración de menos de 1% de la dosis aplicada. Estos estudios arrojan resultados de 30% de invasión por parte *S. carpocapsae* (Epsky y Capinera, 1994), los cuales son superados por los porcentajes de penetración de la cepa Colombia de *S. feltiae* con un 76% para *G. mellonella* y un 100% de mortalidad. Respecto a la capacidad de penetración de *S. feltiae* en *T. solanivora* cuando se

infecta en arena o suelo, el nematodo aumenta su agresividad y su capacidad de búsqueda, causando la muerte de la totalidad de las larvas: Esto contradice a Sáenz (1998), que sostiene que el nematodo muestra poca habilidad para descubrir su hospedante al cambiar las distancias de búsqueda o al colocar obstáculos como suelo.

No se encontraron diferencias entre las dosis y el porcentaje de penetración; la mortalidad del hospedante no se ve afectada por la dosis del nematodo, pues al ingresar sólo un JI, éste es capaz de causar la muerte a su hospedante sin tener en cuenta el sustrato en que se encuentre, por lo que el determinar una dosis es bastante cuestionable. Además, existe un número máximo de JI que ingresa al hospedante y no sobrepasa la dosis que se aplicó, por lo que se deduce que es una capacidad de carga que permite que el nematodo se pueda reproducir dentro del hospedante. El tiempo de exposición de *T. solanivora* a *S. feltiae* muestra que el nematodo mata rápidamente, puesto que a las 12 horas el 90% de los insectos están muertos; sin embargo, se deben hacer pruebas más rigurosas en periodos de tiempo más cortos.

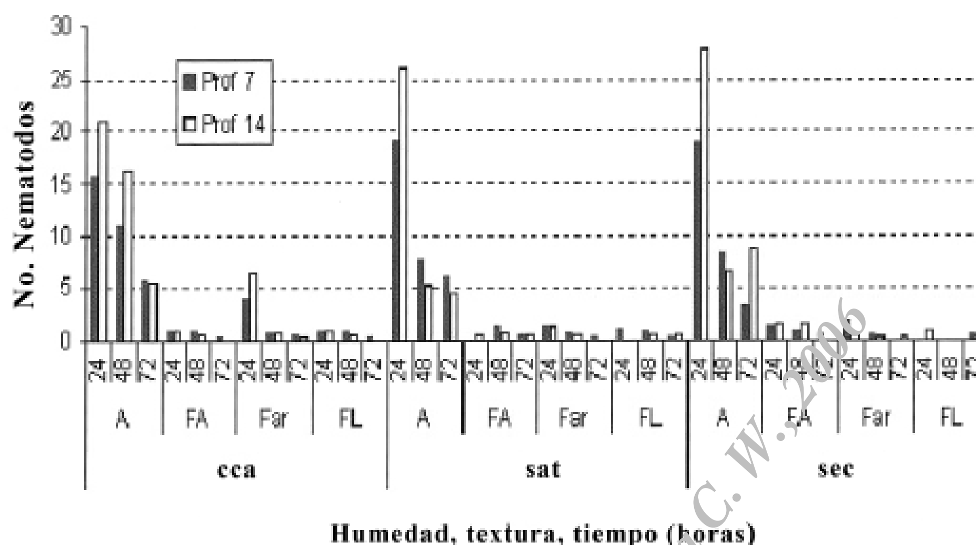
Pruebas en columna de arena

Movilidad de JI de *S. feltiae*. El modelo para la movilidad es altamente significativo para las dos distancias a las que se contó el número de nematodos (Distancia 1 (7 cm): $F = 15,86$; $GL = 35$ $Pr > 0,01$; Distancia 2 (14 cm): $F = 10,89$; $GL = 35$; $Pr > 0,01$); se encontraron diferencias significativas en suelo, tiempo y la interacción suelo*tiempo para las dos distancias, presentándose el mayor efecto en el tipo de suelo. No hay efecto entre distancias de movilidad.

En la gráfica 2 se observa que el mayor movimiento del nematodo se realiza en arena, seguido del FAr, FA y, por último, el FL, para las dos distancias. El mayor número de nematodos se encuentra a las 24 horas

para las dos distancias; aunque en la distancia 2 (14 cm) se encontraron más nematodos, el mayor número de éstos se observó en el suelo FAr a las 24 horas, seguido de FA y, por último, el FL. A medida que pasa el tiempo el número de nematodos disminuye en la columna de suelo. La humedad no presenta significancia para la movilidad del nematodo, sin embargo, el mayor número de nematodos se presentó en capacidad de campo, seguido de seco y por último el saturado, en la distancia 2 (14 cm). En las interacciones fue muy similar, presentándose el mayor número de nematodos en suelo A a capacidad de campo, seguido por el FAr, luego el seco con suelo A, seguido del FA y por último el saturado con el suelo A, seguido del FAr. Con respecto al tiempo, el mayor número de nematodos se encuentra hacia las 24 horas en las tres humedades. Al evaluar las larvas a las 72 horas, se encontraron nematodos en diferentes estados de desarrollo, J4, adultos, tanto hembras como machos de primera generación. También se encontraron JI alrededor de los insectos y no se encontraron diferencias significativas al compararlos con las otras dos distancias ($F = 2,60$; $gl = 11$; $P > 0,011$). En suelo seco se encontró el mayor número de larvas vivas, en texturas FL y FA con un 50 % de supervivencia.

La movilidad de JI de *S. feltiae* se ve afectada por el tamaño de las partículas del suelo, por las diferencias entre arena y los otros tipos de suelo, confirmando lo enunciado por Kaya (1990) y Koppenhofer y Kaya (1996). Al observar las interacciones, el nematodo se moviliza mejor en arena y a las 24 horas ya se habían desplazado un gran número de JI, no se afecta la supervivencia, como lo menciona Kaya (1990), en otras especies de esteinernematidos. Se observó que en los diferentes tipos de suelo la movilidad se ve afectada por la compactación del suelo y por la falta de estructura del mismo, sin embargo, los JI llegaron a infectar las larvas cebo. Lo anterior tiene en cuenta que la humedad en la supervivencia y movilidad del nematodo lo puede afectar al disminuir dramáticamente su movilidad y modificar la infectividad del nematodo (Koppenhofer *et al,* 1995).



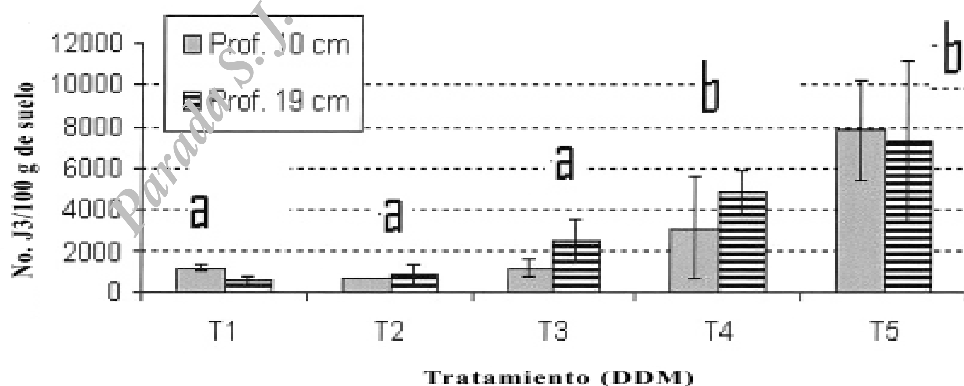
Gráfica 2. Juveniles inafectivos de *S. feltiae* desplazados verticalmente entre las 24 y 72 horas a profundidad de 7 y 14 cm., en texturas de suelo: A: Arena; FA: franco arenosa; Far: franco arcillosa y FL: franco limosa, y humedades: cca: capacidad de campo; sat: saturado; sec: seco. Evaluada a dos profundidades: Prof 7: profundidad de 7 cm y Prof 14: profundidad de 14 cm.

El efecto del tiempo es bastante significativo sobre la movilidad; la mayoría de los JI se encuentran a las 24 horas y la larva cebo se ve infectada a las 72 horas, por lo que el JI recorre una distancia de 25 cm en menos de 72 horas, permitiendo así que el nematodo infecte a larvas presentes en suelo de primer instar de *T. solanivora*, puesto que tiene una movilidad muy semejante en cuanto a velocidad. Las mejores condiciones se darían para suelo a capacidad de campo, debido a que en condiciones naturales el nematodo requiere de una película de agua para su desplazamiento cuando busca a su hospedante, además de una buena concentración de oxígeno. Con otras condiciones, el nematodo tiende a disminuir su movilidad, patogenicidad y supervivencia (seco (1%)), y cuando el suelo tiende a compactarse por la saturación (56%) de humedad, el nematodo pierde movilidad. Algunas observaciones similares, anota Kaya (1990), ocurren con otras especies de nematodos, como *S. carpocapsae*, *Heterorhabditis* sp., *H. bacteriophora* y *S. glaseri* en suelos de tipo arenoso, arcillo arenoso,

franco limoso, en donde a diferentes potenciales de agua la infección del nematodo se observa disminuida drásticamente.

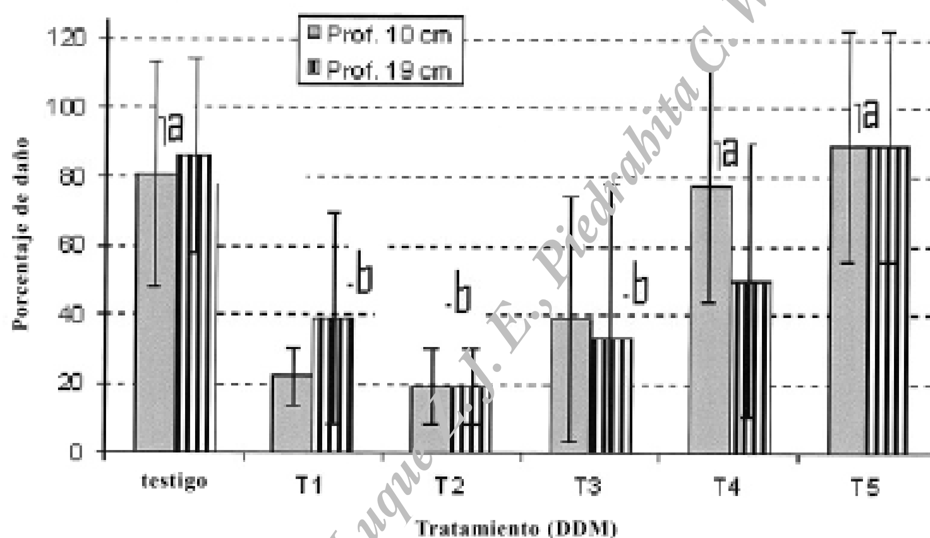
Movilidad en columna de suelo

Capacidad de búsqueda 1. El modelo presenta significancia (F = 3,54; GL = 35; P > 0,01). El porcentaje de daño estadísticamente muestra que existen diferencias altamente significativas en tiempo (F = 16,34; GL= 5; P > 0,01), siendo no significantes la profundidad y la interacción tiempo-profundidad. Cinco días después de la infestación, el daño fue superficial, cerca al 25 %, encontrándose nematodos de segunda generación entre las galerías. A partir de los 10 DDM, en los otros tratamientos se encontró hasta un 100% de daño, con galerías profundas, pudrición y alta humedad dentro del tubérculo (gráfica 3). No existen diferencias significativas entre profundidades, pero los niveles de daño en las dos profundidades no superan el 50% en promedio con respecto al testigo en los tratamientos 5 DDM, 10 DDM y 15 DDM, tanto para tiempo como para profundidad. Sin embargo, los dos últimos tratamientos igualan o superan el porcentaje de daño (hasta 100%) al testigo.



Gráfica 3. Nematodos recuperados de suelo cada 5 días después de la infestación con huevos de *T. solanivora* en tubérculos, a dos profundidades en cilindros.

El modelo para recuperación de nematodos mostró alta significancia (F = 11,02; g l = 9; P > 0,001), al igual que en tiempo (F = 23,16; GL = 4; P > 0,001), encontrando la mayor recuperación en el 25 DDM (P10 = 7865 JI/100g de suelo, P19 = 7333 JI/100g de suelo) y el menor número de nematodos recuperados fue en el 10 DDM (P10 = 656 JI/100g de suelo, P19 = 829 JI/100g de suelo), es indiferente la profundidad (gráfica 4).

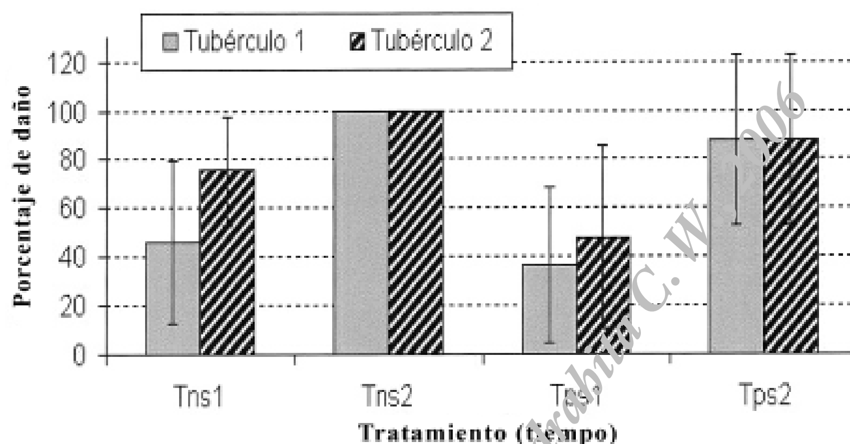


Gráfica 4. Porcentaje de daño de *T. solanivora* en tubérculos de *S. phureja* a dos profundidades en cilindros con suelo. Los tratamientos consistieron en: T1: 5 días después del montaje (DDM); T2: 10 DDM; T3: 15 DDM; T4: 20 DDM; T5: 25 DDM.

Capacidad de búsqueda 2. El porcentaje de daño estadísticamente muestra que no existen diferencias significativas entre tratamientos y tipos de suelos, siendo el mayor ataque en suelo natural con 100 % para los dos tratamientos. A los 5 DDI el daño fue superficial, entre el 10 y el 50%, y a los 20 DDI fue del 100 % con respecto al testigo.

No se observaron diferencias significativas en el modelo (F = 0,78; gl = 3; P = 0,51), se evidencia la recuperación de nematodos

independientemente del tratamiento al suelo. Se recuperó un mayor número de nematodos en el 20 DDI (171 JI/100 g para suelo natural y 263 JI / 100g para suelo pasteurizado (gráfica 5).



Gráfica 5. Porcentaje de daño de *T. solanivora* en tubérculos de *S. phureja* en suelo pasteurizado (ps) y suelo natural (ns).

Para los dos ensayos se recuperaron pupas y larvas de primer y segundo instar afectadas por el nematodo, en las que se pudieron observar JI emergiendo de ellas. Se estableció la presencia de nematodos en varios estados de desarrollo como JI y adultos, en especial hembras grávidas de segunda generación. Se observó que algunas larvas no fueron atacadas por el nematodo y culminó su ciclo de vida, además de encontrar organismos dentro del tubérculo, como ácaros en todos sus estados de desarrollo. No se observó mortalidad por otro tipo de organismos diferentes al nematodo.

Durante los ensayos de capacidad de búsqueda se encontró que la profundidad no afecta la capacidad de localizar tubérculos de la larva de *T. solanivora,* ni el comportamiento del nematodo para buscar, localizar e infectar a la larva fuera y dentro del tubérculo. No hubo diferencias para el porcentaje de daño entre los tratamientos del suelo, aunque por el tiempo transcurrido entre los dos tratamientos, el ataque

de la plaga fue más severo para 20 DDI. El daño presentado en el tubérculo demuestra que el nematodo es eficiente en la búsqueda del insecto, pues se encontró larvas parasitadas, además de nematodos en varios estados de desarrollo dentro de los tubérculos, lo que permite inferir que el nematodo tiene la posibilidad de localizar a la larva de *T. solanivora* posiblemente por los excrementos que ésta va dejando a medida que se alimenta (Gaugler, 1999). Se observó que el nematodo ataca todos los estados de desarrollo de *T. solanivora* que permanecen en el suelo, lo que indica alta patogenicidad del nematodo, además de su capacidad de infección. Además, éste presenta gran capacidad de búsqueda por su condición de buscador-emboscador, forrajea para detectar su hospedante y así invadirlo, o puede esperar a que llegue el hospedante para penetrarlo e infectarlo (Gaugler 1999; Forcheler y Gardner, 1991; Baur *et al*., 1998).

En cuanto a la capacidad de búsqueda, *S. feltiae* es capaz de localizar y matar a *T. solanivora* en columna de suelo y dentro del tubérculo, con el 100% de parasitismo de las larvas y pupas. El nematodo puede localizar las larvas de *T. solanivora* penetrando al tubérculo por medio de las galerías que las larvas construyen durante su alimentación. Las diferencias que encontramos de tiempo en la recuperación de nematodos probablemente se deban al tamaño de la larva de *T. solanivora*. Al transcurrir el tiempo, se encontraron larvas de mayor tamaño, con mayor capacidad de sostener un número de nematodos en los estados larvales tercero y cuarto, especialmente a los 20 y 25 DDM.

Los estados de desarrollo del nematodo como son J4 y adultos encontrados en las galerías del tubérculo migraron debido a la alta humedad que se presentó dentro del mismo. El daño en el tubérculo, al ser superficial, permitió que el nematodo penetrara más fácilmente, localizando a su blanco y causando la muerte de la larva, dejando sólo el exoesqueleto o la cápside. El daño más severo y profundo fue

observado en larvas y restos de éstas con evidencia de haber sido atacadas por nematodos. Las diferencias en el daño a los tubérculos se deben al tiempo que transcurre para la liberación del nematodo; el ataque de *T. solanivora* se hace más severo a medida que pasa el tiempo. La larva crece hasta alcanzar el cuarto instar, cuando consume más, y luego abandona el tubérculo en busca de suelo, donde pupa.

Las pupas pueden ser infectadas por los JI que se encuentran en el suelo o puede ocurrir dentro del tubérculo. Alvarado *et al.* (1998) confirma lo anteriormente descrito: entre más tarde se liberen los JI, hay mayor posibilidad de desarrollo de las larvas de *T. solanivora* y, por tanto, mayor daño. Adicionalmente, la actividad del nematodo se puede ver afectada por la presencia de otros organismos, como ácaros de la familia Tetranychidae, coleópteros de las familias Staphynilidae y Carabidae, sinfilidos, anélidos y algunos hongos, tanto por el ataque directo como por competencia (Ishibashi y Kondo, 1987; Koppenhöfer y Kaya, 1996; Baur *et al*., 1998). Se concluye que *S. feltiae* tiene una gran capacidad de búsqueda al localizar rápidamente a su insecto blanco; además presenta gran movilidad y capacidad de sobrevivencia en condiciones adversas del suelo, que se pueden presentar por la textura, humedad y temperatura, y a su alta patogenicidad al matar al insecto en menos de 24 horas.

Referencias

ALVARADO, B.; ENRÍQUEZ, S.; BECERRA, O. 1998. Patogenicidad de *Steinernema feltiae* cepa Villapinzón sobre *Tecia solanivora* atacando tubérculos de *Solanum tuberosum* variedad sabanera. En: Seminario perspectivas sobre nematodos fitopatógenos y entomopatógenos en Colombia U.N. Bogotá.

BAUR, M.E.; KAYA, H.K.; TABASHNIK, B.; CHILCUTT, C.F. 1998. Suppression of diamond black moth (Lepidoptera: Plutellidae) with and

entomopathogenic nematode (Rhabditida: Steinernematidae) and *Bacillus thuringiensis* Berliner. Journal of economic entomology 91(5): 1089-1095.

CAROLI, L.; GLAZER, I.; GAUGLER, R. 1996. Entomopathogenic nematode infectivity assay: multi variable comparison of penetration into different hosts. Biocontrol Science and Technology 6: 227- 233.

CORREDOR, T. 2001. Procedimientos para la producción masiva *in vivo* de nematodos entomoparásitos. En Memorias del seminario: Nematodos entomoparásitos una alternativa en MIP. Bogotá, Agosto 24 de 2001.

EPSKY, N.; CAPINERA, J. 1993. Quantification of invasion of two strains of *Steinernema carpocapsae* (Weiser) into three lepidopteran larvae. Journal of Nematology 25 (2): 173-180.

EPSKY, N.; CAPINERA, J. 1994. Invasion efficiency as a measure of efficacy of the entomogenous nematode *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). Journal of Economic entomology. 87(2): 366-370.

FORCHELER, B.T.; GARDNER, W.A. 1991. Field efficacy and persistence of entomogenous nematodes in the management of white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) in turf and pasture. Journal of Economic Entomology 84 (5): 1454-1459.

GAUGLER, R. 1999. Matching nematode and insect to achieve optimal field performance. En: Optimal use of insecticidal nematodes in pest management. Proceedings of Workshop. August 28-30. New Brunswick, New Jersey, USA.

GARZÓN, M.; AZA, B. 1994. Potencial del nematodo *Steinernema* sp. para el control biológico del gusano blanco de la papa *Premnotrypex vorax* (Hust). Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá D. C. (Tesis Ingeniero Agrónomo).

HERRERA, F. 1997. La polilla guatemalteca de la papa. Biología, comportamiento y prácticas de manejo integrado. Corpoica. Produmedios. Santa fe de Bogotá, D. C. Colombia.

ISHIBASHI, N.; KONDO, E. 1987. Dynamics of the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* applied to soil with and without nematicide treatment. Journal of Nematology 19 (4): 404-412.

KAYA, H.K. 1990. Soil ecology. En: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. Ed. Gaugler R. y Kaya H.K. CRC Press. Boca Raton. Pp 93-115.

KAYA, H.K.; STOCK, S.P. 1997. Techniques in insect nematology. Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, N. Y. P. 281-324.

KOPPENHÖFER, A.; KAYA, H. 1996. Coexistence of entomopathogenic nematode species (Steinernematidae and Heterorhabditidae) with different foraging behavior. Fundam. Apple Nematology. 19 (2): 175-183.

KOPPENHÖFER, A.; KAYA, H.; TAORMINO, S. 1995. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures. Journal of Invertebrate Pathology 65:193-199.

PARADA, J.C. 2001. Steinernemetidae y heterorhabditidae en áreas de producción papera en Cundinamarca. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Bogotá.

RODRÍGUEZ, C. 1988. Propuesta para modificar la cuantificación del daño de polillas de tubérculos de papa. Investigación agrícola. 2 (2):39-41. San José (Costa Rica).

SÁENZ, A. 1998. *Steinernema feltiae* Filipjev 1934 cepa Villapinzón (Rhabditida: Steinernematidae). Ciclo de vida, patogenicidad. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Bogotá.

STOCK, S.P. 1998. Sistemática y biología de nematodos parásitos y asociados a insectos de importancia económica. Universidad Nacional De Litoral, Esperanza, Santa fe, Argentina, Octubre 1998.

WESTERMAN, P.R. 1999. Aggregation of entomophatogenic nematodes, *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp., among host insects at 9 and 20°C and effects on efficacy. Journal of Invertebrate Pathology 73: 206-213.

Capítulo 3

Escalamiento Masivo

- Selección de medios de cultivo para *Xenorhabdus bovienii*, simbionte de *S. feltiae*

- Escalamiento por fermentación en medio sólido y líquido de *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae), cepa Colombia

Selección de de medios de cultivo para *Xenorhabdus bovienii*, simbionte de *S. feltiae*[1]

Martínez P. J.[*], Vanegas, J.[**], Sánchez J.[***] y Parada J. C.[****]

Resumen

Se seleccionó un medio para el cultivo axénico de *Xenorhabdus bovienii* con características potenciales para la producción masiva *in vitro* del nematodo entomopatógeno *Steinernema feltiae*. Se emplearon como criterios de selección parámetros de las cinéticas de crecimiento bacteriano y la relación del dimorfismo bacteriano (fases I y II), mediante medición indirecta en un periodo de tiempo de fermentación, evaluando 9 medios reportados: YS, TSB Pronadisa® y Oxoid®, BSA, BM, LLM, HGEIm y HGEIs (suplementados con aceites maíz y soya) y MX (yema de huevo-aceite de girasol). Las cinéticas de crecimiento en el medio MX mostraron una mayor duración de la interfase entre el periodo de crecimiento exponencial y el estacionario, como se confirmó con el mayor intervalo de cambio de fase según la variación del indicador (10-11 horas) en este medio, con respecto a los demás (menos de 9 horas). Las condiciones que presentó *X. bovienii* en el medio MX resultan potencialmente importantes para optimizar el desarrollo y reproducción del nematodo durante procesos de producción *in vitro* por fermentación.

Palabras clave: *Xenorhabdus bovienii*, nematodos entomoparásitos, fermentación, crecimiento microbiano.

---

[1] Proyecto Conciencias. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Código 1101-07-14930 - Contrato 475-2003.
[*] Ingeniero Químico – Biólogo, estudiante M. Sc., U. N., sede Bogotá, ojmartinezp@unal.edu.co
[**] Biólogo, estudiante M. Sc., Microbiología
[***] jsanchezn@unal.edu.co
[****] insectsyco@icqmail.com

Introducción

Al igual que los demás nemátodos entomoparásitos (NE), *Steinernema feltiae* posee una característica altamente patogénica de una elevada especialización, debido a que ha desarrollado la capacidad de transportar en su intestino una bacteria simbionte del género *Xenorhabdus*, la cual introduce y libera en el interior del insecto. Esta bacteria se reproduce dentro del hospedero, causándole una septicemia letal (Boemare y Akhurst, 1988). El juvenil infectivo (JI), llamado también J3 o "Dauer", ingresa a través de la boca, el ano o los espiráculos del insecto, penetra la pared del sistema digestivo y entra a la cavidad corporal. Una vez dentro del artrópodo, el nematodo libera la bacteria al hemocele, donde ésta prolifera, mata al insecto y establece las condiciones apropiadas para la reproducción del nematodo mediante suministro de nutrientes, producción de antibióticos y toxinas que inhiben microorganismos competitivos, todo esto dentro de un periodo de 24 a 72 horas (Smigielski *et al*., 1993).

El medio de cultivo para la producción *in vitro* de nematodos entomoparásitos en un cultivo monoxénico debe cumplir con requisitos nutricionales que satisfagan las necesidades tanto de la bacteria como del nematodo. La composición nutricional del medio es un componente importante en la producción de juveniles infectivos y puede determinar su producción final en la fermentación (Friedman *et al*., 1989). Una composición que no sea óptima dará lugar a una baja producción de la bacteria, que resultará en una pobre calidad del nematodo, tanto en patogenicidad como en una reducida estabilidad de almacenamiento (Hatab y Gaugler, 2001). La selección del medio involucra variables biológicas, bioquímicas, fisicoquímicas y operacionales en la optimización de la calidad y producción. La bacteria simbionte *X. bovieni* pertenece a la familia Entero-bacteriaceae; es un bacilo Gram negativo, inocuo a vertebrados, que presenta un dimorfismo denominado fase I y fase II (FI y FII). La primera forma, o FI, está definida como la que

es transportada dentro del nematodo infectivo, es inestable y da lugar a la segunda forma que puede subsecuentemente revertirse. Estas formas, que difieren en su efecto sobre la reproducción del nematodo *in vivo* e *in vitro*, se distinguen gracias a su pigmentación diferencial (adsorción del azul de bromotimol) en agar (Boemare y Akhurst, 1987), en medio líquido y a su actividad antimicrobiana.

En FI forman colonias redondas pequeñas en medios con agar, adsorben el rojo neutral en Agar MacConkey y en NBTA (Boemare y Akhurst, 1987), adsorben el Azul de Bromotimol (ABT) y degradan el Cloruro de Trifeniltetrazolio (CTT). En FII, las colonias son más grandes y no adsorben colorantes, pero se tiñen de rojo al degradarse el CTT (Woodring y Kaya, 1988; Kaya y Stock, 1997). Este es un proceso reversible de FII a FI, identificado como fase de variación inversa (Akhurst y Boemare 1990), en donde ambas variantes son patogénicas al ser inyectadas a larvas de *Galleria mellonella,* pero con una virulencia menor en la FII. La FI también posee una mayor habilidad para proveer nutrientes a los nematodos, tanto en el insecto como en cultivos monoxénicos o en medios artificiales (Akhurst, 1980; Bedding, 1981, 1984).

El presente trabajo tiene como objetivo la selección de un medio para el cultivo axénico de *X. bovienii* por medio de parámetros de cinética de crecimiento, identificando sus posibles implicaciones con el crecimiento de los nematodos, para ser producidos *in vitro* como biocontroladores. Algunos aspectos como la obtención de la bacteria simbionte, su caracterización, identificación, pruebas de antibiosis y patogenicidad, son tema de otros trabajos presentados en este libro y que, en conjunto con este, pretenden establecer las condiciones para producir *S. feltiae* de calidad para el control de plagas en Colombia. Este trabajo se realizó gracias al apoyo dado por Colciencias, la Facultad de Agronomía y el Laboratorio de Microbiología del Suelo (Departamento de Biología) de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

Metodología

Obtención de *X. bovienii* en un medio axénico

La bacteria simbionte se obtuvo aislándola de la hemolinfa de larvas de *G. mellonella* de último instar, infectadas con *S. feltiae* según la metodología descrita por Akhurst (1980). Los aislamientos se caracterizaron en medio NBTA (Agar nutritivo + 0,0025% ABT + 0,004% de CTT) y en agar McConkey (Woodring y Kaya, 1988).

Tamaño del inóculo de *X. bovienii*. Para determinar el tamaño del inóculo bacteriano, se empleó el medio YS (Dye, 1968), que es usado en diversos trabajos relacionados con la fermentación de *X. bovienii* (Ehlers *et al*., 1989). Se realizaron lecturas de absorbancia a 540 nm (Valencia, 2004) en diferentes tiempos, con cuatro concentraciones de inóculo: 3, 6, 10 y 15% del volumen final. El inóculo se realizó a partir de una colonia de *X. bovienii* mantenida a 4 °C en una caja de NBTA, inoculando en un erlenmeyer con 20 ml de YS.

Este preinóculo se mantuvo en agitación por 13 horas a 130 rpm y a 25 °C; luego de este tiempo se tomó una alícuota de 0,3, 0,6, 1,0 y 1,5 ml, respectivamente, que fue sembrada por triplicado para obtener concentraciones finales en erlenmeyers adaptados con una fotocelda para espectrofotometro Spectronic 20D. Así mismo, se sembraron alícuotas de dichas concentraciones para realizar conteo en placa de células viables con lecturas de unidades formadoras de colonia por mililitro de muestra (UFC/ml) (Madigan *et al*., 2001). Todos los erlenmeyers se llevaron a un volumen final de 10 ml.

Selección del medio de cultivo

Se realizaron curvas de crecimiento de *X. bovienii* en 9 diferentes medios reportados en la literatura. Se evaluaron los medios YS (Dye, 1968), TSB (Trypcase Soy Broth) Pronadisa® y Oxoid®, BSA (LCM en Ehlers *et al*., 1998), BM (Medio Basal) y LLM (Medio Lípido Líquido) y

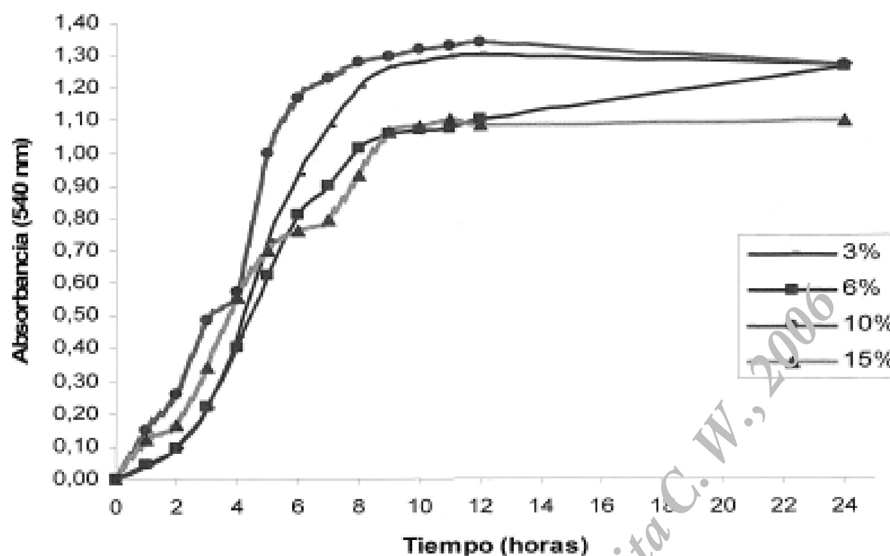


Figura 1. Cinética de crecimiento de *X. bovienii* partiendo de 4 diferentes concentraciones de inóculo bacteriano (3, 6, 10 y 15%) en medio YS.

suplementados con aceites maíz-soya (HGEIm y HGEIs) (Hatab *et al*., 1998) y yema de huevo-aceite de girasol (MX), cuyos componentes se encuentran en el anexo 1.

Se realizaron lecturas de absorbancia a 600 nm y conteo de células viables (UFC/ml), de la misma forma descrita anteriormente para la obtención del inóculo bacteriano. Cabe anotar que la lectura de absorbancia se realizó a 600 nm para poder efectuar comparaciones con otros trabajos ya realizados en este campo.

Ensayos de cambio de fase según viraje del indicador en medio líquido

Para cada uno de los medios de cultivo probados se realizaron fermentaciones de 50 ml, introduciendo indicador de cambio de fase en cada medio axénico líquido (0,0025% ABT + 0,004% CTT), registrando fotográficamente el cambio de coloración a diferentes horas de crecimiento bacteriano.

Resultados y discusión

Inóculo y cultivo axénico de la bacteria

Los resultados obtenidos en cuanto a la concentración de inóculo bacteriano con respecto a la cinética de crecimiento para las concentraciones evaluadas, se encuentran registrados en la figura 1. Entre las 8 y las 12 horas de crecimiento se observó el cambio de fase de crecimiento exponencial a crecimiento estacionario para cada cinética, sin embargo, para el 15% de inóculo se presentó el crecimiento más acelerado de biomasa en las primeras horas, estabilizándose a partir de la décima hora de crecimiento. Los niveles de las concentraciones de inóculo 3% y 10% presentaron una tendencia similar entre sí, con una fase estacionaria muy marcada, dado que se alcanzó un máximo entre esta fase y la de crecimiento exponencial.

De acuerdo con la figura 1, para el tratamiento con la concentración al 6% se presentó un crecimiento continuo durante todo el intervalo de medición, y el cambio entre las fases de crecimiento exponencial y la estacionaria fue leve en comparación con el mostrado por los otros niveles de concentración de inóculo. Este comportamiento sugiere que se está dando una rápida adaptación al medio por parte de la bacteria o que el incremento de biomasa y/o los metabolitos producidos por las bacterias no están afectando el aporte nutricional del medio de manera considerable.

Debido a que las dos formas (FI y FII) de *X. bovienii* están relacionadas con el tiempo de incubación, la estabilidad del medio y las metodologías empleadas en su cultivo (Boemare y Akhurst, 1988), se puede decir que existe una mayor relación FI/FII en el periodo de crecimiento exponencial, disminuyendo a medida que aumenta la población bacteriana; sin embargo, con el inóculo al 6% dicha relación experimentaría una disminución menos marcada en el tiempo con

respecto a las otras tendencias. Mantener una mayor relación FI/FII implica tener un mayor lapso de tiempo para que los nematodos se puedan desarrollar completamente en un medio *in vitro* y presentar mayor letalidad, hecho demostrado para nematodos desarrollados en cultivos *in vitro* con alta concentración de bacterias en FI en su intestino. En FII se ha reportado una virulencia reducida (Vogyi *et al*., 1998).

Se encontró una tendencia general en la cinética de crecimiento de *X. bovienii* en todos los medios evaluados (figura 2). La bacteria presentó dos fases claramente distinguibles y una intermedia. La primera fase se encontró hacia las primeras horas, incluyendo las fases de latencia y la de crecimiento exponencial hasta las 8 a 10 horas de crecimiento. En la décima hora, fase intermedia, disminuyó el número de células viables en todas las concentraciones evaluadas. Este hecho, que se presenta en la figura 2 y figura 3 como una generalidad para todas las graficas, sugiere un efecto diáuxico que propone una adaptación por parte del microorganismo a otra fuente de nutrientes. Sin embargo, se plantea la hipótesis de que se presente un reajuste en el crecimiento celular debido a la alta concentración de bacterias alcanzadada (entre 5,0 x 10^{9} y 1,4 x 10^{10}) en el medio y a un cambio en su metabolismo al iniciar la fase de crecimiento estacionario. El periodo de crecimiento estacionario se distinguió en la medición de absorbancia por tener una baja pendiente, hecho que, sin embargo, no necesariamente implica un equilibrio entre las células que se generan con las que mueren, como se demostró con la medición de UFC/ml.

El conteo de células viables pone de manifiesto el crecimiento continuo de la bacteria durante el periodo de tiempo evaluado, llegando a valores superiores a 1 x 10^{11} UFC/ml, como lo demuestran los resultados de conteos encontrados en medios suplementados con aceite de maíz (figura 2 g), HGEIm y aceite de soya (figura 2 h), HGEIs. Este cambio abrupto de inflexión en la cinética de crecimiento podría estar marcando el paso de una mayor concentración de bacterias en FI a un aumento

Tabla 1. Tiempos de generación de *X. bovienii* expresados en horas (h) en los diferentes medios evaluados en dos intervalos de tiempo de la fase de crecimiento exponencial para UFC/ml

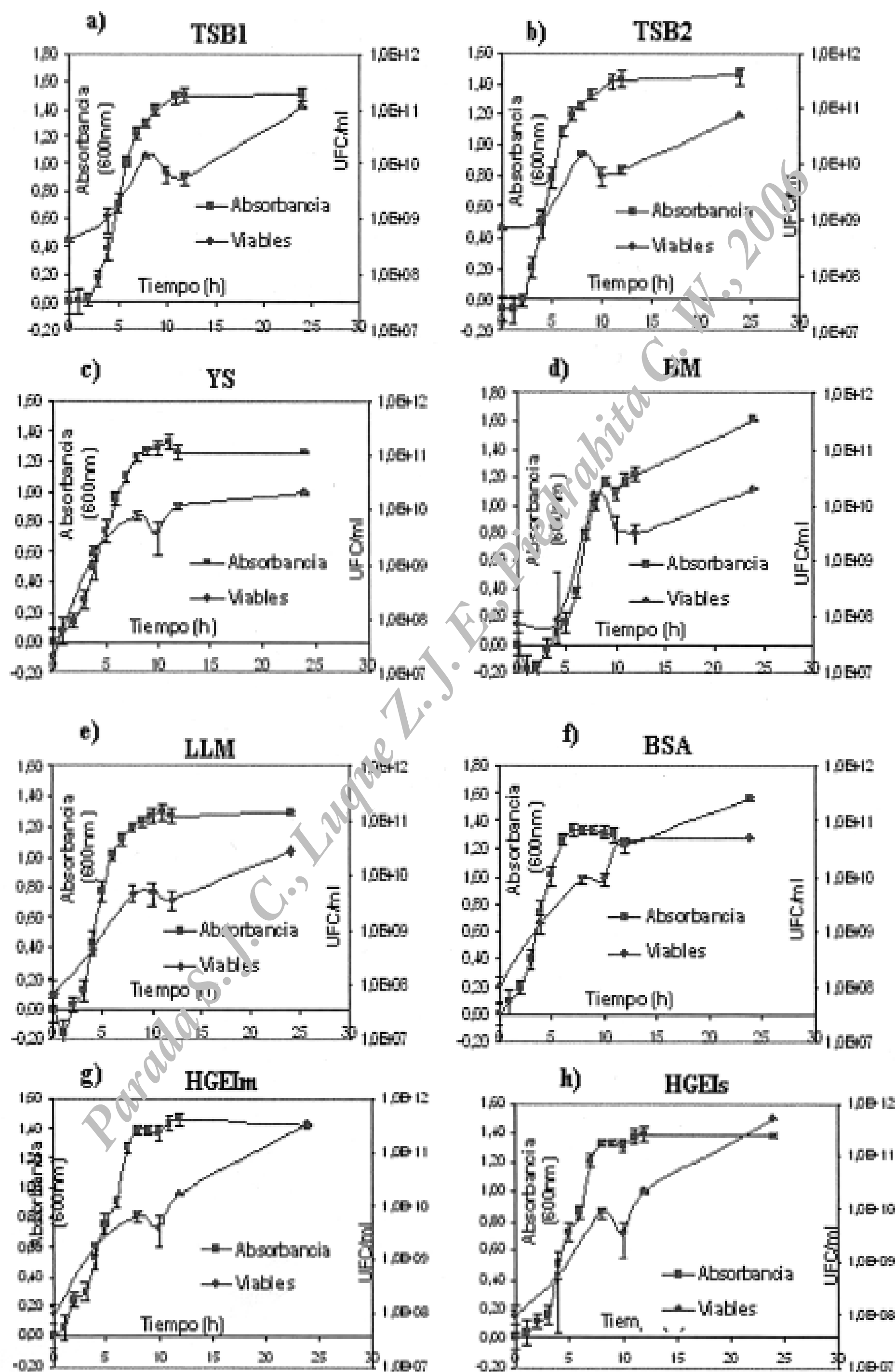
MEDIO INTERVALO	YS	TSB 1	TSB 2	BSA	MB	LLM	HGEIm	HGEIs	MX
0 – 4 h	0,631	3,025	7,940	14,280	1,527	1,031	0,958	1,555	1,317
4 – 8 h	3,966	1,076	2,336	1,252	2,646	3,526	4,760	2,378	14,218

en la concentración de las mismas en la forma FII, encontrando de esta manera una relación directa de las fases de crecimiento bacteriano de *X. bovienii* con el dimorfismo inherente que se presenta en el cultivo *in vitro*.

Otro aspecto que cabe resaltar es la diferencia en la composición de los diferentes medios evaluados, básicamente partiendo del suplemento de aceites. Las figuras 2 a, 2 b y 2 c reflejan la tendencia que presentó la bacteria en medios sin suplemento lipídico (TSB1, TSB2 y YS, respectivamente), encontrándose valores de UFC/ml no mayores a 1,0 x 10^{11} a las 24 horas, aunque presentaron bajos valores de tiempo de generación al final del periodo de crecimiento exponencial (segundo intervalo), como se observa en la tabla 1. Es posible comparar algunos de los componentes si se observa el anexo 1, como sucede con los medios TSB1 y TSB2 al compararlos con el resto. Estos medios presentan azúcares como fuente de carbono (dextrosa y glucosa, respectivamente) y muestran los mayores tiempos de generación en el intervalo de 0 a 4 horas, junto con el medio BSA que posee caldo de soya tripticasa. Este hecho sugiere que tales fuentes de carbono afectarían negativamente el crecimiento de *X. bovienii,* generando un mayor periodo de latencia por el desarrollo de la maquinaria celular que degrada tales compuestos.

Otros medios como los HGEIm y HGEIs, que incluyen extracto de levadura, peptonas y un gran suplemento de aceite, presentaron un

Figura 2. Crecimiento de biomasa bacteriana. Medición de UFC/ml y absorbancia en los medios evaluados para *X. bovienii.*



9

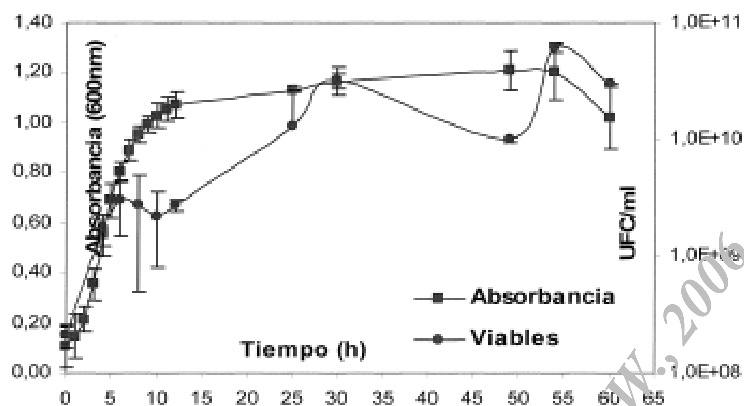


Figura 3. Cinética de crecimiento del medio MX en un periodo de 60 horas de fermentación.

crecimiento constante de forma prolongada con valores máximos cercanos del orden de $1,0 \times 10^{12}$ UFC/ml. Sin embargo, dado que todos los medios son diferentes en composición y concentración de nutrientes, no es posible hacer un mayor análisis a este respecto.

El último medio (MX), que se presenta en la figura 3, fue evaluado durante 60 horas de fermentación, encontrándose un crecimiento continuo de *X. bovienii*, con el mismo patrón identificado para los otros medios (figura 2). Se resalta la utilización de este medio porque presenta ventajas para un futuro escalamiento con respecto a los otros medios evaluados, por la facilidad de consecución de los componentes y su bajo costo; además, ha ofrecido buenos resultados en cuanto a producción de NE en otras investigaciones, según Abu Hatab (1998) y Parada (2004, com. pers.).

Los tiempos de generación encontrados del medio MX (tabla 1) presentaron la característica de tener un crecimiento acelerado en las primeras horas (0-4), luego de las cuales el crecimiento disminuyó notablemente y fue aumentando de forma escalonada. Esto ofrece

condiciones estables para el nematodo, donde la alta cantidad de células viables ofrecen una mayor probabilidad de encontrar bacterias en FI, lo cual es uno de los criterios decisivos a la hora de seleccionar el medio. A las 24 horas, la biomasa se incrementó llegando a un máximo hasta la hora 54 de fermentación y decayó posteriormente, por absorbancia y conteo de viables. La lectura de células viables en el medio MX fue seguida por dos semanas, al cabo de las cuales se encontraron 1,0 x 10^{13} UFC/ml. Estas etapas sugieren una actividad constante de la bacteria, lo cual es imprescindible para el desarrollo de *S. feltiae* en condiciones *in vitro*. A pesar de que estudios anteriores (Bedding, 1981) recomiendan liberar huevos luego de 3 días de cultivo bacteriano, se ha descubierto que los dos organismos pueden ser introducidos simultáneamente al medio, sólo si una gran concentración de bacterias es suministrada (Gaugler y Han, 2002). En ambos casos, se estaría garantizando el hecho de no sólo alcanzar una buena concentración bacteriana en el medio, sino que la relación FI/FII sea la mayor posible.

Variación de fase según cambio en la coloración del medio por la presencia de indicador (ABT y CTT)

Pruebas preliminares fueron realizadas con todos los medios propuestos determinando un tiempo de variación de fase en que el viraje del medio, debido a la adsorción del indicador por las células y no por cambios en el pH del medio, se hace evidente por la intensidad de la coloración. El cambio se determinó sobre la base de la comparación con la coloración inicial del medio. Para todos los experimentos se observó una suspensión rojizo claro (medio MX), carmelita (medios TSB y YS) o roja intensa (medios HGEI y BSA) al cabo de 12 horas. El medio cambió de manera notoria a las 9 horas para los medios YS y MB, a las 7 horas para los medios HGEIm y HGEIs, a las 10 a 11 horas para el medio MX y a las 8 horas para los restantes (TSB, LLM y BSA). Esto obedecería a una mayor concentración de células en FII en el medio, lo que se puede observar fácilmente si se relacionan los dos tiempos extremos de cambio

de coloración (7 horas para el medio HGEI y 10-11 horas para el medio MX) con el momento de inflexión de la zona de crecimiento exponencial en la línea de absorbancia en las figuras 2 (h y g) y 3, dado que es precisamente en este tiempo que varía la tendencia en la línea del crecimiento. Se puede concluir que el momento en que se produce la inflexión en la gráfica de la cinética de crecimiento, según la absorbancia, estaría dando la pauta para un cambio masivo de FI en FII al teñirse de rojo por la degradación del CTT.

La variación en la coloración del medio de cultivo MX se presentó entre las 8 y 12 horas, con un cambio de amarillo verdoso a rojo café. Sin embargo, el medio mostró siempre una coloración azul verdosa en la interfase líquida cuando se dejaba en reposo, hecho que hace pensar en una alta concentración de células en FI por la adsorción del BBT. En la superficie se encontró una apariencia de nata grumosa con la coloración característica que presentan las colonias en FII en agar NBTA. A partir de este hecho se infiere que la forma secundaria FII de *X. bovienii* se presenta junto con la coalescencia de las células en el medio líquido, mientras que células libres en la suspensión se mantendrían en FI, estado en que se encuentran generalmente en el interior del nematodo (Boemare y Akhurst, 1987). La mayor prolongación del cambio de fase en el medio MX con respecto a los demás medios se presentó como otra ventaja, debido a que se obtiene la posibilidad de introducir huevos posteriormente a la inoculación de la bacteria durante un rango más amplio. De esta forma, se garantiza que la relación FI/FII será siempre mayor en el medio MX que la misma relación en otros medios y susceptible a optimizarse.

Anexo 1. Composición en gramos por litro (g/l) de nutrientes en los diferentes medios probados para seleccionar el medio de cultivo.

Medio Composición		YS	TSB 1 (Pronadisa)	TSB 2 (Oxoid)	BSA	BM	LLM	HGEIm	HGEIs	MX
NaCl		6	5	5	5			2	2	0.5
KCl					0.35			5.5	5.5	
$CaCl_2$					0.21			2.1	2.1	
MgSO4		0.2								
Dextrosa			2.5							
Glucosa				2.5						
Papaic digest soybean meal				3						
Dry egg yola										1.25
NH4H2	PO4	0.5								
K2H		0.5	2.5	2.5				5.2	5.2	
Caldo Nutritivo					10		30			
Extracto	Levadura	5.0			5	30	3	5	5	2.3
	Carne							3	5	
Peptona	Soya		3				3	3	3	
	Caseína		17	17	5	40		27	27	
Caldo Soya Tripticasa					10					
Aceite	Soya						10		30	
	Maíz					0.2		30		
	Girasol				30					4

Referencias

AKHURST, R.J. 1980. Morphological and Functional Dimorphism in *Xenorhabdus* spp., Bacteria Symbiotically Associated With the Insect Pathogenic Nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*. Journal of General Microbiology 121, 303-309.

AKHURST, R.J.; BOEMARE, N.E. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus* spp., In: R. Gaugler and H. Kaya (ed.), Entomopathogenic nematodes in biological control CRC Press, Boca Raton, Fla. Pp. 75-90.

BEDDING, R.A. 1981. Low cost *in vitro* mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. Nematologica 27: 109-114.

BEDDING, R.A. 1984. Large scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes *Neoaplectana* spp. And *Heterorhabditis* spp. Annals of Applied Biology 104, 117-120.

BOEMARE, N.E.; AKHURST, R.J. 1988. Biochemical and Physiological Characterization of Colony Form Variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae) En: Journal of General Microbiology 134, 751-761.

BOEMARE, N.E.; AKHURST. R.J. 1987. Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). J. Gen. Microbiol. 134: 1835-1845.

DYE, D.W. 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The "amylovora" group. New Zealand Journal of Science 11, 590-607.

EHLERS, R.U.; LUNAU, S.; KRASOMIL-OSTERFELD, K.; OSTERFELD, K.H. 1998. Liquid culture of the entomopathogenic nematode-bacterium-complex *Heterorhabditis megidis/ Photorhabdus luminescens*. BioControl 43: 77-86.

FRIEDMAN, M.J.; LANGSTON, S.E.; POLLITT, S. 1989. Mass Production in Liquid Culture of Insect-Killing Nematodes. Int. Patent WO89/04602.

GAUGLER, R. Y HAN, R. 2002. Production technology. In: Gaugler R, (Ed.) Entomopathogenic Nematology. CABI, In Press.

HATAB, M.; GAUGLER, R.; EHLERS R.U. 1998. Influence of Culture Method on *Steinernema glaseri* Lipids. J. Parasitol., 84(2), pp. 215-221.

HATAB, M.; GAUGLER, R. 2001. Diet Composition and Lipids of *In vitro*-Produced *Heterorhabditis bacteriophora*. En: Biological Control. 20, 1-7.

KAYA, H.K; STOCK, S.P. 1997. Techiques in insect nematology. En: Lacey LA (Ed.), Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, San Diego, CA, pp. 288-324.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. 2001. Brock, Biología de los microorganismos. Prentice Hall. Octava edición. España. Pp. 150-158.

VALENCIA, H. 2004. Manual de prácticas de microbiología básica. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 140 p.

VOLGYI, A.; FODOR, A.; SZENTIRMAI, A.; FORST, S. 1998. Phase variation in *Xenorhabdus nematophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 64: 1188-1193.

WOODRING, J.L.; KAYA, H.K. 1988. Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes, A Handbook of Techniques. Southern Cooperative Series Bulletin, Arkansas Agricultural Experiment Station. 331: 30.

Escalamiento por fermentación en medio sólido y líquido de *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae), cepa Colombia[1]

Parada. J. C.[*], Martínez J.[**] y Sánchez J.[***]

Resumen

Se evaluaron y definieron metodologías para el escalamiento de juveniles infectivos de S. feltiae por fermentación en medio en matraz y líquida en reactor, con los medios HGEI y MX suplementados con tejido de hígado de cerdo.

Introducción

Actualmente en Colombia el uso de nematodos parásitos de insectos se encuentra limitado por la mínima oferta de productos comerciales a base de especies nativas, altos costos de producción por métodos *in vivo*, pocas especies nativas disponibles y altos costos de importación de formulaciones comerciales ofertadas en el mercado mundial. Lo anterior limita los métodos de aplicación, estabilidad y baja actividad parasítica de los nematodos sobre los insectos blanco, respecto a la alta capacidad parasítica de las especies nativas (Parada, 2004; Melo, *et al*. 2005).

La producción por fermentación implica establecer condiciones de medio de cultivo que garanticen la adaptabilidad del complejo bacteria-

[1] Proyecto Colciencias-Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Código 1101-07-14930. Contrato 475-2003.

[*] Biólogo M. Sc., Entomología, estudiante Ph. D., Facultad de Agronomía U. N., Bogotá, D.C., insectsyco@icqmail.com

[**] ojmartinezp@unal.edu.co

[***] jsanchezn@unal.edu.co

nematodo, ya que la interacción de dicho complejo es esencial para la muerte del hospedante. Medios complejos, ricos en peptonas, lípidos, extractos de levadura y carne, han sido favorablemente usados para mantener y proliferar tanto la bacteria como el nematodo (House *et al*., 1965; Woodring y Kaya, 1988). Sin embargo, este proceso varía de acuerdo con los componentes del medio, la tasa de transformación por parte de la bacteria, del nematodo y del complejo bacteria-nematodo (Chavarria *et al*., 2003). En Colombia, experiencias a baja escala han permitido producciones de 2 x 10^4 J3/mes, presentando mortalidad y contaminación a causa del uso de equipos no óptimos para este tipo de multiplicación (Torres y Parada, 2000). Dentro de estos propósitos, este documento presenta resultados del escalamiento masivo de *S. feltiae* por procesos de fermentación en medios sólido y líquido.

Los ensayos aquí presentados determinaron las condiciones de desarrollo del complejo bacteria-nematodo, en condiciones de fermentación en medio sólido a nivel de matraz y líquido en reactor de 3L, evaluando los medios que permitieron mayor crecimiento del simbionte y desarrollo de juveniles infectivos en condiciones de cultivo monoxénico. Los medios fueron suplementados con 100 g de hígado de cerdo deshidratado por litro de medio. De igual manera, se evaluó su efectividad como fuente nutricia semisólida y líquida, al adicionar 100 g de harina de maíz por litro de medio, para lograr textura semisólida.

METODOLOGÍA

Material biológico

Se partió de una cría *in vivo* del nematodo *Steinernema feltiae*, cepa Colombia, del laboratorio de suelos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, mantenida sobre larvas de *Galleria mellonella* y *Tecia solanivora*, de acuerdo con los

procedimientos citados por Woodring y Kaya (1998). A su vez, se usaron aislamientos de fase I y fase II de la bacteria simbionte *Xenorhabdus bovienii*, almacenados en glicerol a -75 °C.

Preparación de la bacteria

Se transfirieron células bacterianas de agar TSB, a matraz de un litro, con 200 ml de medio TSB al 3% y 0,5% de extracto de levadura, incubando a 25 °C con agitación de 120 rpm. Pasadas 12 horas, las células se cosecharon y se concentraron por centrifugación a 3.000 rpm/30 minutos; se lavaron en buffer (0,5% cloruro de sodio; 0,68% difosfato de potasio; pH ajustado a 6,6 con hidróxido de sodio 5M). Las células se resuspendieron en tubos de ensayo con buffer M9 (12,0 g Na_2HPO4, 10 g NaCl, 6,0 g KH_2PO_4, 0,25 g $MgSO_4$*7H2O, 1 l de agua destilada estéril -ADE-), en concentraciones de 4 x 10^{10} células por ml.

Preparación de inóculo de nematodos

Se usaron huevos de hembras grávidas de 5 días de infección, degradas por lisis alcalina, con hipoclorito de sodio al 0,2% y NaOH, 0,6 M por 15 minutos. Los huevos fueron lavados en ADE, filtrados en tamiz 635µ y concentrados en buffer M9 estéril. Para la obtención de J1, los huevos se incubaron en buffer M9 por 12 horas, temperatura ambiente y 80 rpm. Para retirar los J1 de la solución se usaron montajes White y lavados en tamices 400µ y 500µ.

Montaje en matraz medio semisólido

Se dispusieron 3 x 10^{10} células del simbionte, procedentes de medio TSB, en 170 g de esponja de poliuretano en cuadros de 1 cm^2 , con 200 cc de medio HGEII y MX, en tres matraces de 1.000 cc cada uno, previamente autoclavados durante 25 minutos, los cuales se colocaron en agitador orbital a 200 rpm y 25 °C, en completa oscuridad. Se evaluaron los tiempos de liberación (12 y 24 horas de fermentación del simbionte) para inocular en promedio 1.000 huevos axénicos por ml, por matraz. Luego de 72 horas de inocular los huevos, se realizaron

registros diarios para verificar la presencia de juveniles y sus características morfológicas.

Montaje en reactor medio líquido

Comprendió la evaluación de los medios HGEII y MX suplementados con hígado de cerdo deshidratado, sin harina de maíz. Para este fin, 3 x 10^{10} células del simbionte, en 50 ml de medio TSB, fueron dispuestas en bioreactor de 3 litros, cargado con 1.500 ml, de medio líquido. Se evaluaron parámetros de tiempo de fermentación de 12 y 18 horas para inocular, en promedio, 50 huevos axénicos por ml de medio. De igual manera, se establecieron los parámetros de fermentación: velocidad en las aspas del impulsor, tipo propela marina 0,2 m/s y 0,4 m/s; 25% y 30% de saturación de oxígeno y temperaturas de 26 ^{o}C y 30 ^{o}C. Se ajustaron los valores de pH al inicio en 5,9 a 6,2, y sus variaciones fueron reguladas con adición de solución buffer fosfato M9. Luego de 72 horas de inocular los huevos, se realizaron registros diarios para verificar la presencia de juveniles y sus características morfológicas.

Recuperación de JI

Los juveniles infectivos obtenidos en matraz y en reactor fueron sometidos a continuos pases con solución tipo ringer (11,25 g NaCl, 0,525 g $CaCl_2$ *$2H_2O$, 0,315 g $MgSO_4$, 0,1 g acido ascórbico, 0,25 % Formaldehido, 1 l ADE) y agua destilada estéril, sobre tamices 400µ y 500µ, para posteriormente ser almacenados en arena de río estéril, entre 7 y 10 ºC.

Resultados y discusión

Obtención de huevos axénicos

El tratamiento de hembras de primera y segunda generación, con solución de 0,6 M de NaOH, digiere cutícula en tiempo promedio de 10 minutos, obteniendo huevos de todos los estados de desarrollo, 100%

viables y axénicos. Regularmente se reportan soluciones de NaOH a 4, 0 M (Ehlers, *et al*., 1990), sin embargo, esta concentración aumentó la digestión de la cutícula de las hembras tratadas, particularmente de primera generación. Los huevos lavados con ADE por centrífugación presentan destrucción del corium; por tanto, fueron lavados en ADE con tamiz 400 µ, 500µ y 630µ, para garantizar la integridad del huevo en cualquier estado de desarrollo. Las hembras expuestas a esta concentración vierten el útero antes de morir, optimizando la obtención de los huevos; sin embargo, es necesario iniciar rápidamente el lavado de los huevos con ADE, para evitar la degradación del corium.

Producción en matraz medio semisólido

El medio HGEII registra J1 hacia las 96 horas, donde presenta su mayor densidad a las 96 horas: 1.112 J1/500 µl de muestra, ya que hacia las 120 horas, la población disminuye ostensiblemente: 500J1/500 µl, una población completamente muerta. Los muestreos hasta las 240 horas no registraron población alguna, el pH del medio se elevó a rangos entre 7,2 a 8,5. Esta condición alcalina es probablemente la causante del detrimento de los huevos y la mínima eclosión de juveniles. Durante el muestreo se registraron desechos de cutícula en el medio, así como huevos y juveniles deshidratados. El medio presentó olor fermentado fuerte y cierta cantidad de agregados de grasas en las superficie de las espumas; el aumento de acidez se debió probablemente a la formación de ésteres.

El medio MX permitió el desarrollo de juveniles, adultos y una nueva generación de juveniles e infectivos con doble cutícula, en un periodo de 552 horas (tabla 1). Durante este proceso se registró un pH promedio de 6,8, llegando a 7,2 en la cosecha; el medio mantuvo textura constante, virando de marrón a beige claro. Los juveniles se movilizaron más hacia el exterior de las espumas, mientras que los adultos estuvieron dentro de las espumas. El comportamiento de agregación y nictación ocurrió sólo en juveniles infectivos con doble cutícula (JII).

Tabla 1. Estados de desarrollo de *S. feltiae,* cepa Colombia, en matraz con medio MX. TDI = tiempos después del inóculo de huevos; H = huevo; J1 = juvenil 1; J2 = juvenil 2; JI = Juvenil infectivo; JII = juvenil infectivo con doble cutícula; J4 = juvenil 4: Am = macho adulto; Hg = hembra grávida. Las cifras resaltadas con subrayado indican la población dominante en la muestra en el tiempo. Las celdas resaltadas en gris son la primera generación de juveniles.

TDI	Estados de desarrollo de *S. feltiae*										
24	H										
48	H										
96	H	J1									
120	H	J1	J2								
144		J1	J2	JI							
168		J1	J2	JI							
192		J1	J2	JI							
216		J1	J2	JI	J4						
240		J1	J2	JI	J4						
264			J2	JI	J4	Am					
288			J2	JI	J4	Am	Ah	Hg	J1		
312				JI	J4	Am	Ah	Hg	J1	J2	JI
336				JI	J4	Am	Ah	Hg	J1	J2	JI
360				JI	J4	Am	Ah	Hg	J1	J2	JI
384				JI	J4	Am	Ah	Hg	J1	J2	JI
408						Am	Ah	Hg	J1	J2	JII
432							Ah	Hg	J1	J2	JII
456								Hg	J1	J2	JII
480									J1	J2	JII
504									J1	J2	JII
528									J1	J2	JII
552										J2	JII
Cosecha de juveniles infectivos											

Respecto al ciclo de vida de *S. feltiae*, sobre *G. mellonella*, reportado por Triviño (2001), el desarrollo de juveniles de una segunda generación de adultos, a partir de huevos de hembras de primera generación, toma un tiempo de 156 horas, mientras que probablemente sea resultado de las condiciones propias de los montajes, falta de algunos

suplementos nutricionales en el medio, como aminoácidos y algún grupo en particular de lípidos, básicos en los procesos de formación de proteínas y, principalmente, en el desarrollo de estados adultos (Dunphy y Webster, 1989; Gil *et al*., 2002).

La generación de adultos alcanza un máximo de 2 hembras por macho, menor a la registrada por Sáenz (1998) y Triviño (2001), quienes registran una relación de 3,5 para adultos de primera generación. La hembras presentan en promedio 275 huevos (ds = 17,07), valor levemente superior a la capacidad de carga registrada para hembras de segunda generación (225 huevos/ hembra), y muy por debajo respecto a hembras de primera generación obtenidas en cría sobre G. mellonella (900 huevos/ hembra) (Triviño, 2001).

Sin embargo, se destaca que aun así, las hembras depositaron los huevos al medio y se registró un buen desarrollo de juveniles infectivos que en la cosecha llegaron a contabilizar aproximadamente 19,2 x 10^6, 76.800 JI/ml, en aproximadamente 23 días de proceso, a partir del inóculo de huevos. Este valor puede considerarse aceptable en términos de producciones de JI por procesos de fermentación, como los reportados por autores como Pace et al., hacia 1986, que registra una producción de 80.000 JI/ml durante 15 días de fermentación, a partir de inóculo de juveniles 1 aislados de medios monoxénicos.

Producción en reactor medio líquido

Inóculo de huevos a las 18 horas de inicio de fermentación de *X. bovienii*, a las velocidades en las aspas de V1 = 0,2 m/s y V2 = 0,4 m/s; las temperaturas de T1 = 26 °C y T2 = 30 °C, y los porcentajes de saturación de oxígeno O1 = 25% y O2 = 30%, no presentó desarrollo de juveniles en el medio HGEII. De nuevo, como en montaje en matraz, el pH del medio se elevó a rangos entre 6,9 y 7,5 al momento de inóculo de huevos (12 horas) de fermentado de bacteria y aunque se ajusto a 5,8 adicionando buffer M9, a las 24 horas se registró en 7,9 a 8,1,

presentando producción de espuma que se controló al adicionar buffer M9 y solución antiespumante Breox FMT 30®. Durante los muestreos no se registraron desechos de cutícula en el medio, ni tampoco huevos o juveniles muertos.

Para el medio MX, se realizaron en total ocho fermentaciones, correspondientes a combinaciones de valores de velocidad, saturación de oxígeno y temperatura. Las combinaciones V1O1T2, VIO2T1, VIO2T2, V2O1T2, V2O2T1 y V2O2T2 no permitieron la eclosión ni el desarrollo de nematodos en ningún estado de desarrollo. La tendencia general fue la variación de pH de 7,5 a 8,0 y formación de espumas, en especial combinaciones con temperaturas de 30 °C y saturación de oxígeno en 30%.

El escalamiento del complejo bacteria-nematodo, a temperaturas superiores a 28 °C, acelera la variación de fases (Buecher y Popiel, 1989; Akhurst y Boemare 1990), permitiendo una alta población de fase II hacia las primeras 8 horas, proceso poco favorable para los huevos y la nutrición de juveniles J1, ya que aunque haya nutrientes, las poblaciones de bacterias en fase I están disminuidas.
La combinación de parámetros de fermentación, las velocidades (V1 = 0,2 m/s, T1 = 26 °C) y la saturación de oxígeno (O1 = 25%, y V2 = 0,4 m/s, T1 = 26 °C y saturación de oxígeno O1 = 25%) permitieron la eclosión y el desarrollo de juveniles infectivos, pero sólo en combinación VIT1O1 se logró el desarrollo de hembras grávidas e infectivos con doble cutícula, en un periodo de 456 horas (tabla 2). Esto se debió a que en la fermentación V2TIO1, los adultos, particularmente las hembras, se hallaron partidos en dos, probablemente a causa de la velocidad en las aspas. Sin embargo, los juveniles infectivos se desarrollaron entre las 120 y 216 horas de fermentación y se cosecharon ilesos, pero sin segunda cutícula. En las dos fermentaciones, el medio pasó de textura densa a muy liviana. El valor medio de pH se registró en 7,2, mínima de 6,9 y máxima de 7,6 en la cosecha, sin requerir

aplicación de buffer, y la formación de espuma se controló al disminuir el porcentaje de saturación de oxígeno de 25% a 23%, máximo por dos horas para fermentación VIT1O1; además, se varió la velocidad a 0,3 m/s por periodos máximos de una hora, en fermentación V2TIO1.

Tabla 2. Comparación de valores de largo y ancho de JI y machos obtenidos en este estudio, respecto a JI y machos de varias cepas de *S. feltiae*.

AUTOR	ESTADO	LARGO		ANCHO	
		MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO
Wout´s, (1980)	J3	800	750-950	25	22-27
	MACHO	934	850-1000	75	60-90
Sáenz (1998)	J3	800	680-900	26	24-34
	MACHO	1250	1085-1430	86	82-98
Parada (2001)	J3	808	631-914	25	20-30
	MACHO	916	823-986	77	59-91
Triviño (2001)	J3	819	713-933	26	22-31
	MACHO	1257	891-1646	136	94-189
JI de matraz	J3	774	694-855	20	19-21
	MACHO	918	850-987	123	94-152
JI de reactor	J3	684	658 -710	19	17-21
	MACHO	854	710-998	103	92-114

El desarrollo de juveniles de una segunda generación de adultos en fermentación VIT1O1, toma un tiempo de 144 horas, entre las 240 y 384 horas, menor a fermentación matraz y de cultivo in vivo en *G. mellonella*. La capacidad de carga de las hembras desarrolladas en el medio mostró un promedio de 80 huevos/hembra, lo que equivales al 68% menos que en las hembras escaladas en matraz. La morfometría de los estados de desarrollo están por debajo de las tallas registradas en el cultivo solido en matraz y en promedio 40% menos que las reportadas por Triviño (2001) y otros autores para el largo y ancho total de *S. feltiae* (tabla 3). La baja capacidad de carga puede atribuirse

Tabla 3. Estados de desarrollo de *S. feltiae,* cepa Colombia, escalados en reactor con medio MX. TDI = tiempos después del inóculo de huevos; H = huevo; J1 = juvenil 1; J2 = juvenil 2; JI = Juvenil infectivo; JII = juvenil infectivo con doble cutícula; J4 = juvenil 4; Am = macho adulto; Hg = hembra grávida. Las cifras resaltadas con subrayado indican la población dominante de la muestra en el tiempo. La celdas resaltadas en gris corresponden a la primera generación de juveniles.

TDI	Estados de desarrollo de *S. feltiae*										
24	H	J1									
48	H	J1	J2								
96		J1	J2								
120		J1	J2	JI	J4						
144			J2	JI	J4						
168			J2	JI	J4						
192				JI	J4						
216				JI	J4	Am					
240						Am	Ah	Hg			
264						Am	Ah	Hg	J1	J2	JI
288						Am	Ah	Hg	J1	J2	JI
312							Ah	Hg	J1	J2	JI
336									J1	J2	JII
360									J1	J2	JII
384										J2	JII
408											JII
432											JII
456											JII
Cosecha de juveniles infectivos											

a la relación de sexos encontrada (1:1), condición que limita el número de hembras disponibles por macho, que en condiciones de cría in vivo es de tres hembras por macho (Sáenz, 1998; Triviño, 2001). Aunque el medio MX ha mostrado ser buena fuente de nutrientes para el desarrollo del complejo bacteria-nematodo, el efecto de factores físicos propios del proceso de fermentación, como la presión de choque ejercida sobre los juveniles a través de las fuerzas generadas durante la agitación, podría esta afectando la capacidad fisiológica y y el óptimo desarrollo físico de los juveniles, particularmente en los momentos de

muda (Dunphy y Webster, 1989), que resulta en las bajas tallas de los adultos y juveniles infectivos obtenidos, además de afectar la integridad física de las hembras, como se verificó en la velocidad de agitación de 0,4 m/s. El desarrollo de juveniles infectivos JII, a partir de huevos depositados por hembras desarrolladas en fermentación con velocidad de agitación de 0,2 m/s, muestra que ajustando estos factores físicos en el proceso se logran poblaciones viables, que en la cosecha de VIT1O1 llegaron a contabilizar aproximadamente 9,6 x 10^6, 6.400 JI/ml, en casi 19 días de proceso.

Referencias

AKHURST, R.J.; BOEMARE, N.E. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus* spp., In: R. Gaugler and H. Kaya (ed.), Entomopathogenic nematodes in biological control CRC Press, Boca Raton, Fla. p 75-90.

BUECHER, E.J.; POPIEL, I. 1989. Liquid Culture of the Entomogenous Nematode *Steinernema feltiae* with Its Bacterial Symbiont. J. Nematol. 21: 500-504.

CHAVARRIA-HERNÁNDEZ, N.; RODRÍGUEZ, A.; GUEVARA, F.; DE LA TORRE, M. 2003. Evolution of Culture Broth Rheological Properties during Propagation of the Entomopathogenic Nematode *Steinernema carpocapsae*, in Submerged Monoxenic Culture. Biotechnol. Prog. 19: 405-409.

DUNPHY, G.B.; WEBSTER, J. M. 1989. The monoxenic culture of *Neoaplectana carpocapsae* DD-136 and *Heterorhabditis heliothidis*. Revue Nematologie 12: 113-123.

EHLERS, R.; STOESEL, S.; WYSS, U. 1990. The influence of phase variants of *Xenorhabdus* spp., and *Escherichia coli* (Enterobacteriaceae) on the propagation of entomopathogenic nematodes of the genus *Steinernema* and *Heterorhabditis*. Rev. Nematol. 13: 417-424.

GIL, G.H.; CHOO, H.Y.; GAUGLER, R. 2002. Enhancement of Entomopathogenic Nematode Production in In vitro Liquid Culture of *Heterorhabditis bacteriophora* by Fed-Batch Culture With Glucose Supplementation.

HOMINICK, W.M. 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: current status, protocols and definitions. Journal of Helminthology 71:271-298.

HOUSE, H.L.; WELCH, H.E.; CLEUGH, T.R. 1965. Food medium of prepared dog biscuit for the mass-production of the nematode DD-136 (Nematyoda: Steinernematidae), Nature 206:84.

MELO, E.L.; ORTEGA, C.A.; GAIGL, A.; BELLOTI, A. 2005. Efecto del estado de desarrollo de *Phylophaga menetriesi*, *Anomala inconstans* (Coleoptera: Melolonthidae) con dos cepas de entomonematodos. Resúmenes XXXII Congreso SOCOLEN, Ibagué, Tolima, Julio 27-29, 80 p.

PACE, G.; GROTE, W.; PITT, D.E.; PITT, J.M. 1986. Liquid culture of nematodes. Int. Patent WO 86/01074.

PARADA, J.C. 2004. *Steinernema feltiae* (Rhabdita: Steinernematidae) modelo de investigación en nematodos entomoparásitos. Memorias XXXI Congreso SOCOLEN, Bogotá, D. C., Julio 28-30, pp. 207-209.

SÁENZ, A. 1998. *Steinernema feltiae* FILIPJEV, 1934, Cepa Villapinzón (Rhabditida: Steinernematidae). Ciclo de vida, patogenicidad y métodos de cría. Tesis M. Sc., Facultad de Agronomía, U.N. de Colombia, Bogotá, D.C.

TORRES, A.; PARADA, J.C. 2000. Fase I en *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae) simbionte de *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae). En: XXVII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología, SOCOLEN. 45 p.

TRIVIÑO, J.C. 2001. Variación morfométrica y capacidad de carga de *Steinernema feltiae* (Filipjev 1934) (Rhabditida: Steinernematidae) cepa nativa bajo condiciones de cría en vivo. En: Resúmenes XXVIII, Congreso SOCOLEN. Pereira, Colombia. Agosto 8-10. 95 p.

WOODRING, J.L.; KAYA, H.K. 1988. Steinernematid and heterorhabditid nematodes. A handbook of biology techniques. Southern Cooperative Series Bulletin, vol. 331 Arkansas, USA: The nematodes Subcommitte of the Southern Regional Project 331; pp. 3-12.

Capítulo 4

Evaluación y Uso

- Evaluación de patogenicidad e infección de la nueva especie *Steinernema scarabaei* Stock & Koppenhöfer (Rhabditida: Steinernematidae) sobre la chisa rizófaga *Phyllophaga* pos. *bicolor*

- Pruebas de laboratorio y campo para la evaluación de la capacidad patogénica y de establecimiento del entomonematodo *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae), para el control biológico de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae)

- Evaluación de cinco aislamientos de nematodos entomoparásitos, nativos e introducidos, para el manejo de chisas rizófagas (Coleoptera: Melolonthidae) de tercer instar

- Evaluación se *Steinernema feltiae,* cepa Colombia, escalado por fermentación sobre *Tecia Solanivora*, en condiciones de cultivo

- Parasitismo de dos cepas de entomonematodos, una nativa (*Steinernema feltiae*, cepa Colombia) y otra introducida (*Heterorhabditis bacteriophora* cepa E-Nema®), sobre los seis estados de desarrollo de *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Heteroptera:Cydnidae) en condiciones de laboratorio

- Evaluación de concentraciones de *Heterorhabditis bacteriophora* (Italia) sobre larvas de segundo instar de *Phyllophaga menetriesi* (Coleoptera:Melolonthidae)

Evaluación de patogenicidad e infección de la nueva especie *Steinernema scarabaei* Stock & Koppenhöfer (Rhabditida: Steinernematidae) sobre la chisa rizófaga *Phyllophaga* pos. *bicolor*

Elsa Liliana Melo M.*, Carlos Alberto Ortega O.**, Andreas Gaigl**, Albrecht Koppenhöfer***, Anthony C. Bellotti**

Resumen

El nematodo entomoparásito *Steinernema scarabaei* fue evaluado para medir su eficacia frente a la especie de chisa *Phyllophaga* pos. *bicolor* que es una plaga importante en el departamento del Cauca. Esta evaluación se realizó bajo condiciones controladas de laboratorio. Se midieron diferentes concentraciones del nematodo frente al tercer instar de la plaga (0, 25, 50, 100, 200 y 400 IJs/larva). La mayor infección se encontró al aplicar 400 IJs/larva (65%). Cuando se evaluó la mortalidad, esta concentración, al igual que en la infección, mostró ser la mejor con un 65%. Estos resultados demuestran que a bajas concentraciones este nematodo funciona mejor que otros evaluados con esta especie de chisa, pudiendo ser potencial agente de control, aunque el hecho de no ser nativa podría dificultar su introducción para ser usada dentro de un paquete de control biológico.

Introducción

El daño del estado larval de los melolontidos (Coleoptera) a las raíces de los cultivos se observa inicialmente como amarillamiento del área

* Autor para correspondencia: Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT. A.A. 6713, Cali. Tel.: 445 00 00, fax.: 445 00 73, E-mail: elmelo@hotmail.com
** Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT.
*** Deparment of Entomology, Rutgers University, New Brunswick, NJ 0890, USA.

foliar, para pasar por plasmólisis hasta la marchitez de toda la planta, debido al consumo de las raíces pequeñas completas hasta la corteza de raíces grandes, involucrando la zona cambial. Según lo observado, la gravedad del daño depende principalmente de: la edad de la larva, siendo el estado III el más dañino; la densidad poblacional del rizófago; la edad del vegetal (cuanto más joven más susceptible); la cobertura vegetal que rodea al cultivo; y la cantidad y tipo de macro y microorganismos entomopatógenos y entomófagos presentes en el sustrato (Ortega, 2005).

En Colombia, los registros muestran 580 especies de estos rizófagos, de las cuales aproximadamente 225 son consideradas plaga, destacándose los géneros *Phyllophaga, Astaena, Plectris, Anomala, Ancongnatha, Cyclocephala,* entre otras (Madrigal, 2002; Morón, 1995; Posada, 1993; Pardo-Locarno *et al*., 1995; Sánchez y Vásquez, 1996; Vallejo, 1997).

Uno de los potenciales agentes de control son los nematodos entomoparásitos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae; estos son organismos que actúan como reguladores de las poblaciones de insectos y otros artrópodos habitantes del suelo presentan una serie de atributos como organismos controladores, que los diferencian de otros grupos de entomoparásitos para controlar organismos, por lo cual son considerados como una excelente alternativa para ser empleados en el Manejo Integrado de Plagas (Luque, 2001).

Estudios mundialmente reportados por diversos autores para el control de chisas (*Rhizotrogus majalis, Phyllophaga fusca, P. anxia* y *Poliphilla comes*) con diferentes especies de nep's de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae hallaron que su uso es promisorio y su efectividad mayor cuando las dosis de nep's usadas son altas; además, por la capacidad de reproducción y supervivencia de los nematodos es posible reducir el número de aplicaciones y eliminar el

uso de algunos insecticidas (Villani y Wright, 1988; Forschler y Gardner, 1991; Klein, 1992; Lacey *et al.,* 1993; Gaugler *et al*., 1994).

Experimentos realizados en invernadero sobre *Phyllophaga menetriesi*, donde se evaluaron tres aislamientos (*S. carpocapsae*, *Steinernema* sp.- SIN y *Heterorhabditis* sp. HNI) en una concentración de 1.000 infectivos juveniles (IJs)/ml, se presentaron parasitismos de 21%, 18% y 18%, respectivamente, sin observarse mortalidad. Para una segunda concentración (25.000 IJs/ml), el parasitismo fue de 55% (*S. carpocapsae*) y 45% (*Heterorhabditis* sp. HNI), con mortalidades de 29% (*S. carpocapsae*) y 9% (*Heterorhabditis* sp. HNI). Otros aislamientos (*S. riobravis*, *Steinernema* sp.- SIN y *Heterorhabditis* sp. CIAT) se evaluaron a una tercera concentración (100.000 IJs/ml), reportándose mortalidades de 33%, 28% y 26%, respectivamente (CIAT, 2003).

En otras investigaciones hechas sobre larvas de melolontidos bajo condiciones controladas de laboratorio, se evaluaron las especies de nematodos *Steinernema* sp. SNI, *Heterorhabditis* sp. HNI y *Heterorhabditis* sp. CIAT sobre larvas de tercer instar de *P. menetriesi.*

En general, el porcentaje de mortalidad fue bajo, 10,5%. Los tratamientos: tres aislamientos, (SIN, HNI, H-CIAT), dos concentraciones (7.000 (7) y 13.000 IJs/ml (13)), dos tiempos (5 y 10 días), con *Heterorhabditis* ocasionaron los mayores porcentajes de mortalidad, con valores de 31,6% para HNI-13-5 y 21% con HNI-13-10 y H-C-7-5; mientras que los tratamientos con SNI-13-5 y SNI-7-10 de *Steinernema* no presentaron mortalidades. Los tratamientos que presentaron mayor porcentaje de penetración (*Steinernema* sp.) no fueron aquellos que causaron la mayor mortalidad (*Heterorhabditis* sp.). El porcentaje de penetración fue generalmente más alto para *Steinernema* sp. (80%) que para *Heterorhabditis* sp. CIAT (52,9%) (CIAT. 2003; Quintero. 2003; Melo y Gaigl. 2004).

Dentro de los nematodos evaluados para el control de scarabeidos se encuentra también *S. scarabaei*, especie nueva, aislada de epizootias en poblaciones de chisas en Nueva Jersey, en las chisas *Exomala orientalis* y *Popilia japonica*.

Este nematodo ha demostrado alta virulencia sobre diversas especies de chisas, en trabajos realizados en laboratorio, invernadero y campo, encontrándose CL_{50} de 5,0 y 5,7 infectivos por larva de tercer instar de *Rhizotrogus majalis* y *Popillia japonica*, respectivamente, mientras que en invernadero controló un 88% a *R. majalis* (2,5 x 10^9 infectivos por ha). Otras especies han sido también muy susceptibles a este nep, presentando mortalidades = 90% con 400 infectivos/larva (Koppenhöfer *et al.,* 2004; Cappaert y Koppenhöfer, 2003).

Por lo expuesto, se implantó este trabajo a fin de evaluar la efectividad de *S. scarabaei* sobre el rizófago *Phyllophaga* pos. *bicolor*, el cual se encuentra en abundancia, alimentándose de raíces de varios cultivos en campos de agricultores del Departamento del Cauca, Colombia.

Metodología

Especie blanco

Para este experimento se seleccionaron chisas de tercer instar de *Phyllophaga* pos. *bicolor* obtenidas en campo, en el Cauca (Caldono, 1.580 msnm; 18 °C), y mantenidas en cuarentena por 20 días en un cuarto de cría, en la misma localidad, en vasos plásticos con suelo del lugar hasta en un 50% de su capacidad.

La cría en laboratorio se mantuvo en una cabina, en vasos plásticos con tapa, con capacidad volumétrica de 100 ml, con arena y suelo orgánico estéril (1:3), alimentadas con trozos de zanahoria, en el laboratorio de Entomología de Yuca del CIAT, bajo condiciones controladas (19 °C, 70 +/- 5%) y total oscuridad.

Nematodos

Se evaluó la especie *Steinernema scarabaei* n. sp., obtenida de la Universidad de Rutgers, NJ, EUA, material enviado en líquido y usado directamente para este ensayo.

Diseño experimental

El experimento se implantó en un diseño experimental completamente al azar (DCA), considerando un factor en estudio compuesto por las concentraciones del nep, con un testigo absoluto de chisas sin ninguna aplicación, y un testigo atípico de *Galleria mellonella*, en arena. Se trabajó con cuatro repeticiones con 12 individuos, empleando las concentraciones de 0; 25; 50; 100; 200 y 400 IJs/ml de *S. scarabaei.*

La unidad experimental consistió de un vaso plástico (capacidad 56 ml) con tapa, colocado en suelo-arena estéril (3:1). Se aplicó 1 ml de la solución y 3 ml de agua destilada estéril (ADE) para ajustar la humedad a capacidad de campo. Para el experimento se aplicaron los nep's un día después de introducir la chisa con un pedazo de zanahoria (6 cm^3) en cada envase. Éstas se mantuvieron en una cabina en condiciones controladas (23 +/- 2 °C, 70 +/- 5%, en total oscuridad). La evaluación se realizó 10 días después de la infección.

Análisis estadístico

Se hizo un análisis de varianza (ANAVA), con separación de medias para determinar rangos (Tukey P = 0,05) para las variables significativas, (Infostat, 2006). Previo al análisis definitivo se realizó una transformación para de los datos utilizando la fórmula $\sqrt{x+1}$, al presentarse valores de cero; sin embargo, para la presentación de las gráficas se utilizaron los porcentajes originales.

Además de observar los signos externos de las larvas como la coloración, se evaluó el porcentaje de mortalidad (larvas muertas con nep,s en su

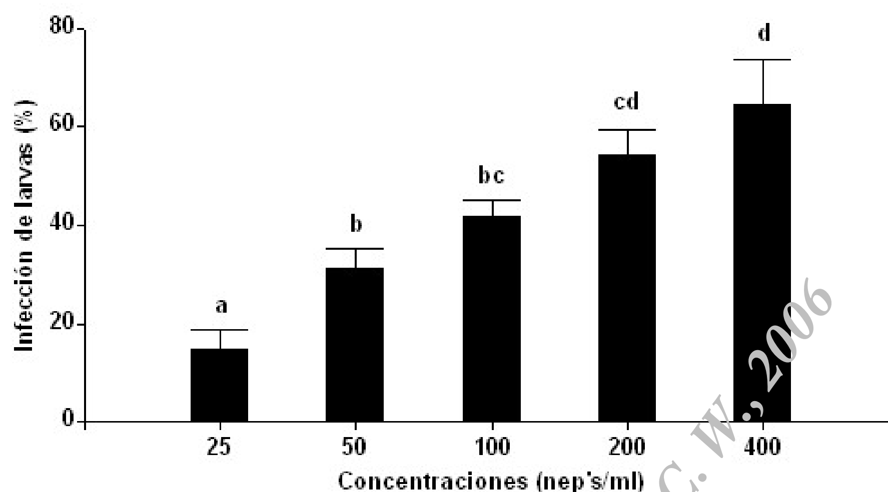


Figura 1. Porcentaje de infección de larvas de tercer instar de *Phyllophaga* pos. *bicolor* con diferentes concentraciones del nematodo entomoparásito *Steinernema scarabaei*, 10 dias después de la infección (ddi), en condiciones de laboratorio. Letras distintas indican diferencias significativas (P = 0,05).

interior) y se determinó el porcentaje de infección disectando las larvas vivas y muertas, bajo el estereoscopio.

Resultados y discusión

Se observó que al aumentar la concentración de infectivos juveniles del nep's, la infección aumentaba, siendo la mejor 400 IJs/ml (65% de infección), seguido de 200 IJs/ml (54% de infección) (F = 68,556; gl = 5; P = 0,0001) (Figura 1).

Las dos concentraciones mayores evaluadas presentaron las mejores mortalidades: 65% con 400 IJs/ml y 50% con 200 IJs/ml, frente a las menores 25 IJs/ml y 50 IJs/ml (15% y 29%, respectivamente) (F = 54,454; gl = 5; P = 0,0001) (Figura 2).

Al comparar los resultados con los obtenidos por Koppenhöfer y Fuzy (2004) cuando evaluaron esta especie de nep frente a las especies de

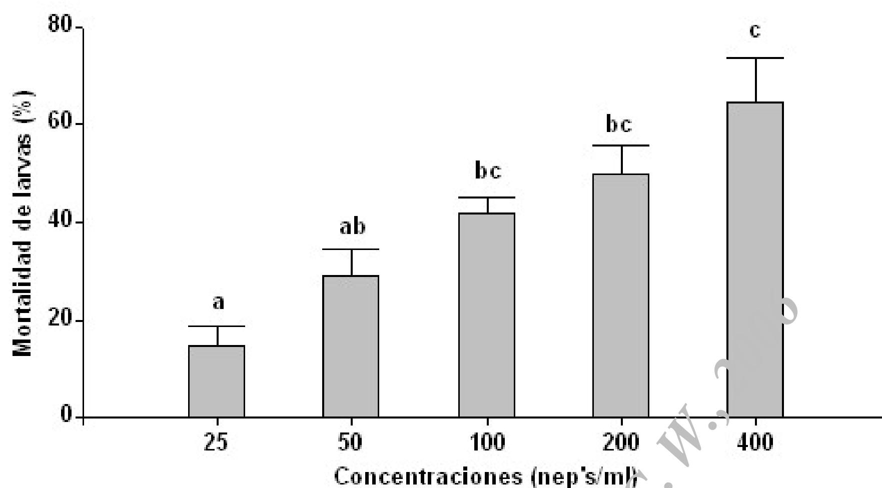


Figura 2. Porcentaje de mortalidad de larvas de tercer instar de *Phyllophaga* pos. *bicolor* con diferentes concentraciones del nematodo entomoparásito *Steinernema scarabaei*, 10 días después de la infección (ddi), en condiciones de laboratorio. Letras distintas indican diferencias significativas (P = 0.05).

chisas *Anomala orientalis* y *P. japonica* y encontraron mortalidades más altas empleando concentraciones similares a las usadas en este experimento (20 IJs/ml: 50 y 98% y 400 IJs/ml: 75 y 95%, respectivamente), se demuestra que *P.* pos. *bicolor* es más resistente a este nep que las especies mencionadas anteriormente.

En otro experimento, donde se evaluó una concentración más alta de infectivos juveniles (10.000 IJs/ml) de *Heterorhabditis* sp. contra *P.* pos. *bicolor*, se obtuvieron mortalidades entre el 60 al 72% (Melo et al., 2004), lo que dejaría a S. scarabaei en una posición ventajosa frente a esta cepa, mostrando mayores mortalidades con concentraciones más bajas para *P*. pos. *bicolor*.

Muchos experimentos, además, plantean que el efecto de los nematodos está fuertemente afectado por la interacción entre la especie de nematodo y la especie de chisa. Algunos estudios han mostrado que este nematodo posee una especialización con el insecto blanco, por

poseer una alta patogenicidad, potencial reproductivo, comportamiento de crucero (buscador de su presa), y la rapidez con que mata a la chisa de este estudio comparado con otros nep's (comportamientos evaluados en laboratorio invernadero y campo). Por lo anterior, esta especie de nep constituye un candidato promisorio para el manejo estas chisas en liberaciones aumentativas o inoculativas (Koppenhöfer y Fuzy, 2004; Koppenhöfer *et al.,* 2004; Cappaert y Koppenhöfer, 2003; Koppenhöfer y Fuzy, 2003). Habiendo verificado que este nematodo elimina a esta chisa con mayor eficiencia que cuando se evaluó con otras especies del insecto y usando concentraciones mayores, lo pondría en ventaja frente a otros, aunque todavía falta investigar su respuesta con otras especies del rizófago (CIAT, 2004).

Finalmente, es evidente que en el Departamento del Cauca y en otros departamentos del eje cafetero, las chisas han sido expuestas a diversidad de insecticidas sintéticos, lo que pudo proveerles cierta resistencia a estos pesticidas, por lo que conviene evaluar productos de nuevas generaciones, además de otros microorganismos benéficos.

Referencias

CAPPAERT, D.C.; KOPPENHÖFER, A.M. 2003. *Steinernema scarabaei*, an entomopathogenic nematode for control of the European chafer. Biological Control 28: 379-386.

CIAT. 2003. Integrated Pest and Disease Managment in Major Agroecosystems. Solid Pest- Cassava and other crops. Pp. 53-69.

FORSCHLER, B.T.; GARDNER, W.A. 1991. Concentration-mortality response of *Phyllophaga horticula* (Coleoptera: Scarabaeidae) to three entomogenous nematodes. Journal Economy Entomology 84 (3): 841-843.

GAUGLER, R.; WANG, Y.; CAMPBELL, J.F. 1994. Aggressive and evasive behaviors in *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae: defenses against entomopathogenic nematode attack. Journal of Invertebrate Pathology 64: 193-199.

INFOSTAT. 2006. Manual del usuario. Grupo INFOSTAT, FCA., Universidad Nacional de Córdoba. Primera edición. Editorial Brujas. Argentina. 318 p.

KOPPENHÖFER, A.M.; FUZY, E.M. 2003. *Steinernema scarabaei* for the control of white grubs. Biological Control 28: 47-59.

KOPPENHÖFER, A.M.; FUZY, E.M. 2004. Effect of white grub developmental stage on susceptibility to entomopathogenic nematodes. Journal of Economic Entomology 97 (6): 1842-1849.

KOPPENHÖFER, A.M.; FUZY, E.M.; CROCKER, R.L.; GELERNTER, W.D.; POLAVAPARU, S. 2004. Pathogenicity of *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema glaseri*, and *S. scarabaei* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) against 12 white grubs species (Coleoptera: Scarabaeidae). Biocontrol Science and Tecnology 14 (1): 87-92.

KLEIN, M.G. 1992. Use of *Bacillus popilliae* in Japanese beetle control. In: T.A. Jackson and T.R. Glare (Editors), Use of pathogens in scarab pest management. Intercept, Andover. Pp. 179-190.

LACEY, L.A.; BETTENCOURT, R.; GARRETT, F.J.; SIMÕES, N.J.; GAUGLER, R.H. 1993. Factors influencing parasitism of adult Japanese beetles, *Popilliae japonica* (Col.: Scarabaeidae) by entomopathogenic nematodes. Entomophaga 38 (4): 501-509.

LUQUE, J.E. 2001. Nematodos entomopatógenos: Un modelo de línea de investigación en control biológico. En: Seminario de nematodos entomoparásitos una alternativa en MIP: "Especies, biología, ecología, multiplicación masiva, técnicas de aplicación, experiencias y perspectivas de uso". Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Agosto 24. Pp. 4-6.

MADRIGAL, A.C. 2002. Plagas forestales de las regiones cálidas colombianas. Memorias. XXIX Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. Montería. Pp. 66-80.

MELO, E.L.; GAIGL, A. 2004. Experiencias con el uso de nematodos entomopatógenos en el manejo de dos plagas subterráneas del trópico central de Colombia. Memorias, XXXI Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. Bogotá. Pp. 203-206.

MELO, E.L.; ORTEGA, C.A.; GAIGL, A.; BELLOTTI, A.C.; EHLERS, R-U.; BORGEMEISTER, CH. 2004. Evaluación de siete cepas de nematodos entomopatógenos para el manejo de de la chisa rizófaga *Phyllophaga* sp. (Coleoptera: Melolonthidae). Resúmenes XXXI Congreso Socolen. Bogotá.

MORÓN, M.A. 1995. La diversidad de coleópteros Scarabaeoide o Lamellicornia en Colombia y su repercusión en el complejo plagas subterráneas. Memorias, II

Reunión Latinoamericana de Scarabaeidología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Pp. 1-3.

ORTEGA, C.A. 2005. Estudios metodológicos para evaluar el impacto económico de escarabajos melolonthidae (Insecta: Coleoptera) en tres cultivos tropicales. Trabajo de grado de M.Sc., en Ciencias en Fitoprotección. Escuela Politécnica del Ejercito del Ecuador. 109 p.

PARDO-LOCARNO, L.C.; FRANCO, M.P.; ALARCÓN, A.A. 1995. Estudios preliminares de las chisas (Coleoptera: Lamellicornia) de San Antonio, Cauca. Registros y observaciones en Laparosticti y Pleurosticti. Revista Colombiana de Entomología 21 (1): 51-57.

POSADA, O.L. 1993. Las chisas, sus enemigos naturales y recomendaciones sobre su manejo. Agricultura Tropical 30 (3): 71-79.

QUINTERO, M.P. 2003. Comparación en laboratorio de la patogenicidad de tres especies de nemátodos entomopatógenos (Rhabditida) sobre larvas de tercer instar de *Phyllophaga menetriesi* (Blanchard) (Coleoptera: Scarabaeidae). Trabajo de grado de Biología. Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Santiago de Cali. 49 p.

SÁNCHEZ, G.; VÁSQUEZ, N.C. 1996. Manejo de plagas en arracacha. Boletín de Investigación, CORPOICA, Ibagué. 43 p.

VALLEJO, F. 1997. Contribución al conocimiento de las plagas subterráneas-chisas (Coleoptera: Melolonthidae) del oriente de Antioquia. Trabajo de grado de Maestría en Entomología. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 236 p.

VILLANI, M.G.; WRIGHT, R.J. 1988. Entomogenous nematodes as biological control agents of European chafer and Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae infesting turfgrass. Journal Economy Entomology 81 (2): 484-487.

Pruebas de laboratorio y campo para la evaluación de la capacidad patogénica y de establecimiento del entomonematodo *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae), para el control biológico de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae)[1]

Luque J. E.*, Corredor T., y Parada J. C**

Resumen

Durante dos ciclos de cultivo de *Solanum tuberosum* variedad parda pastusa, cuatro concentraciones de juveniles infectivos de *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae), cepa Colombia, se liberaron al inicio de la tuberización y pos floración. Para los dos periodos de cultivo, el porcentaje de daño a tubérculos por polilla guatemalteca y gusano blanco no superó el 25%. Se evidenciaron diferencias poco significativas entre las épocas de liberación y entre las dosis de juveniles infectivos aplicados. La sobrevivencia en suelo no supera los 30 días, lo que no garantiza su establecimiento, debido posiblemente a las condiciones de alta salinidad, variaciones en el potencial de hidrógeno y alta compactación por problemas de drenaje que se presentan en los suelos del área de estudio. Aun bajo estas condiciones, los resultados obtenidos confirman la capacidad patogénica de *Steinernema feltiae* bajo condiciones de cultivo y su potencial uso en programas de manejo de los lepidópteros Gelechiidae *Tecia solanivora* y *Pthorimaea operculella*, además del coleóptero Curculionidae *Premnotrypes vorax*, ya sea como estrategia preventiva para manejo de focos de infección o como alternativa de control de poblaciones durante periodos de cultivo.

---

1 Proyecto CEVIPAPA IV Colciencias–Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.
* Biólogo M. Sc., Facultad de Agronomía U. N., Bogotá, D.C. luqsan@cablecentro.net.co
** insectsyco@icqmail.com

Introducción

El comportamiento de hábitat críptico de los insectos dañinos a tubérculos en el cultivo de Papa, tal vez ha sido uno de los principales obstáculos para que el uso de controladores biológicos como bacterias y hongos entomopatógenos, sean alternativas viables de control. La permanencia en más de un 70% del ciclo de vida en suelo y dentro del tubérculo, junto a factores físicos, biológicos y químicos del ambiente suelo, son causas de detrimento del controlador y obstáculo para la efectiva localización del insecto blanco. Por ello depredadores y parásitos de buena movilidad y adaptabilidad a condiciones de suelos agrícolas, como ácaros, insectos inmaduros y nematodos entomoparásitos (NE), son las alternativas a tener en cuenta para el control de este tipo de insectos, principalmente en condiciones de campo.

En Colombia se ha evaluado una cepa introducida de *S. feltiae* contra el cogollero del maíz *Agrotis ipsilon* (Landazábal *et al*., 1973), mostrando capacidad de control no superior al 15%, en condiciones de laboratorio. Con poblaciones nativas, se han reportado resultados promisorios de patogenicidad en condiciones de laboratorio y casa de malla contra plagas de *Solanum* spp., como *P. vorax* (Garzón y Aza, 1994), *T. solanivora* (Parada, Sáenz y Luque, 1998; Corredor. Palacios y Parada, 1999) y *P. operculella* (Parada, 2000).

Este artículo muestra los resultados obtenidos de la primera experiencia de uso de *S. feltiae* en cultivo comercial, mostrando su capacidad de búsqueda, ataque y control de poblaciones de *T. solanivora*, *P. vorax* y *P. operculella*. Además de verificar su potencialidad como agente de control de plagas de suelo en cultivo de papa, los resultados incentivan y promueven la necesidad de continuar y apoyar las fases de investigación sobre producción masiva y ajuste de formulaciones, con miras a aportar una herramienta práctica para el productor de papa en el área andina, evitando además el ingreso y uso de cepas foráneas.

Materiales y métodos

La investigación desarrolló las siguientes fases:

Pruebas y análisis paralelos

Para *S. feltiae*. De acuerdo con las condiciones físicas, químicas y biológicas presentes en suelo y agua del canal de riego, se procedió a realizar pruebas en laboratorio para identificar el comportamiento de los juveniles infectivos (JI) de *S. feltiae*, respecto a niveles de pH e interacción con *Pseudomona fluorescens*, hongos de suelo y ácaros de las familias Tetranychidae y Phytoseiidae. Todos los montajes se realizaron en cajas de Petri de 100 x 15, bajo completa oscuridad, temperatura de ±20 °C y humedad relativa de 65%.

Para *T. solanivora*. Con el fin de garantizar la presencia del insecto dentro del área de cultivo, con poblaciones de cría y naturales, se realizaron ensayos en laboratorio e invernadero para identificar la capacidad de carga de hembras, porcentaje de eclosión de huevos y movilidad de larvas en suelo. Según los objetivos propuestos en el proyecto, durante el ciclo 2 de siembra no se realizaron liberaciones de *T. solanivora* y la presencia de poblaciones de este insecto se detectó con 2 trampas de feromona y principalmente a través de muestreos destructivos semanales, a partir de la primera hasta la sexta semana después de la primera aplicación, para lo cual se procedió a inspeccionar los tubérculos y el suelo de una planta por parcela tratada.

Producción y manipulación de *S. feltiae*

Para la consecución del numero de juveniles infectivos requeridos en la investigación, se desarrolló una cría *in vivo,* según las recomendaciones de Stock (1998). Para este fin, se dispusieron cajas de Petri 100 x 15, conteniendo 150 gramos de arena de río con 5.000

juveniles infectivos, se adelantaron continuas re-inoculaciones sobre larvas de último instar de los lepidópteros Pyralidae *Galleria mellonella* y *Achroia grisella* y también sobre *T. solanivora*. Pasadas 72 horas, las larvas muertas se depositaron sobre papel filtro en cajas de Petri tipo cuadrante de 100 x 15, adicionando 1 ml de agua destilada estéril (ADE). La cosecha de los JI se realizó diariamente, lavando y desinfectando con ADE y estreptomicina, almacenándolos en arena de río estéril a 12 ^{o}C.

Para la aplicación de los JI durante el primer ciclo de cultivo se usó jeringa dosificador LHAURAVET con capacidad de 20 ml, y para el segundo ciclo, bomba de espalda Pulverizadora LHAURAVETÒ de 20 litros, dirigiendo la aplicación directamente hacia la base de la planta. Antes y después de cada aplicación se realizó riego por aspersión. Para el análisis de daño se evaluaron principalmente los 5 surcos centrales, a fin de evitar efectos de borde, registrando peso de tubérculos afectados y sanos por categoría, por parcela. De igual manera, semanalmente se analizaron 100 g de suelo para verificar permanencia, sobrevivencia y patogenicidad de los JI.

Ensayos en campo

Las pruebas se localizaron en los lotes 7 y 8 del Centro Agropecuario Marengo, de la Universidad Nacional de Colombia, en Mosquera-Cundinamarca, área de altos índices de infestación por *T. solanivora, P. vorax y P. operculella*. A fin de lograr coincidencia con periodos de alta infestación, se realizaron dos ciclos de siembra: el primero entre el último trimestre del año 2000 y primer trimestre del 2001; y el segundo ciclo durante el segundo semestre del 2001. Para cada ciclo se sembraron 5 cargas de semilla de *Solanum tuberosum* var. parda pastusa, proveniente del Centro de Investigaciones San Jorge, del ICA, de aproximadamente tres meses de tallado para el primer ciclo y de menos de un mes para el segundo. Dentro del área sembrada se distribuyeron tres bloques con 10 parcelas de nueve surcos de 10

metros de largo y plantas a 0,40 m. El ensayo se ajustó a un diseño de bloques completos al azar con arreglo 2 x 4 x 3, correspondientes a dos épocas de aplicación (E1 y E2), cuatro dosis de JI (D1 = 15.000 JI/m^2 ; D2 = 30.000 JI/m^2, D3 = 60.000 JI/m^2, D4 = 120.000 JI/m^2) con tres repeticiones (bloques), además de contar con un testigo de manejo netamente comercial (TC) y un testigo absoluto (TAB). La distribución en campo muestra 24 parcelas tratadas sólo con dosis de JI, sin ingredientes activos de síntesis química recomendados para el control de *T. solanivora*. Tres parcelas de manejo comercial TC con aplicaciones de ingredientes activos comercialmente recomendados para *T. solanivora*, una vez se presentó en la trampa de feromona 50 adultos/trampa/semana. En las tres parcelas TAB no se realizaron liberaciones de JI ni aplicación de ningún tipo de insecticida de síntesis química. Durante todo el ciclo se llevaron a cabo las labores agrícolas propias de un cultivo comercial.

RESULTADOS

Pruebas y análisis paralelos

***S. feltiae*.** Análisis de muestras de suelo y agua mostraron niveles de pH con tendencia ácida, 4,5 y conductividad promedio de 140 Mv. Se detectó la presencia de *Pseudomonas fluorescens*, copépodos y algunos flagelados en muestras de agua, al igual que ácaros detritívoros, colémbolos y miriápodos en suelo. De acuerdo con los montajes de laboratorio, ni los artrópodos ni la bacteria ejercen efectos deletéreos directos sobre los nematodos, tan sólo niveles muy altos de población competirían por espacio con los JI. Niveles de pH menores a 4,5 y mayores a 7,2 causan muerte a JI; de la misma manera, una conductividad mayor a 160 mV desorienta y limita su capacidad de búsqueda. Estos ensayos ayudan a inferir el comportamiento biológico de los juveniles infectivos de los nematodos, una vez realizada su liberación en campo.

***T. solanivora*.** Al analizar la eclosión y movilidad de larvas en suelo, se estableció que de 100 huevos dispuestos en suelo FAL, a condiciones de capacidad de campo, el porcentaje de eclosión no sobrepasa el 75%, y de estas larvas sólo el 55% llega al tubérculo sembrado a 20 cm de profundidad. Por otra parte, las hembras de cría respecto a las de campo son, en términos generales, de menor tamaño, espermateca reducida y con un 35% menos de capacidad para producir ovariolos. De igual manera, los machos de cría son un 30% más pequeños y de comportamiento errático en la localización de hembras para cópula. Las desventajas vistas entre poblaciones de cría frente a poblaciones de campo descartaron la obtención de poblaciones de larvas en el cultivo, a partir de la liberación de pupas o adultos de *T. solanivora*. Según estos resultados, se optó por liberar aproximadamente 280.000 huevos de *T. solanivora*, 10 días antes del aporque, que al cabo de los 25 días de desarrollo no representaron más del 20% de adultos en campo, los que, por sus desventajas morfológicas, fisiológicas y de comportamiento frente a las poblaciones dominantes en campo, no representan riesgo de aumentos significantes como poblaciones futuras.

Manipulación y comportamiento de *S. feltiae*

Producción y almacenamiento. Se lograron promedios de 30’000.000 JI/ mes, y el almacenamiento de 100.000 JI/g de arena pasteurizada no sobrepasó el 10% de mortalidad, aun a los 90 días.

Liberación. El uso de jeringa mejora la dosificación de JI por planta, pero operativamente muestra deficiencias para aplicaciones en campo, pues aumenta el esfuerzo y tiempo de aplicación, mientras que la bomba de espalda, aunque varía levemente la dosificación de JI por planta, ofrece igual operatividad que la aplicación para los demás productos agrícolas. Es necesario tener en cuenta que la aplicación puede efectuarse entre 15 y 35 psi, y preferiblemente usar boquilla para chorro, evitando boquillas de formación de conos de aspersión,

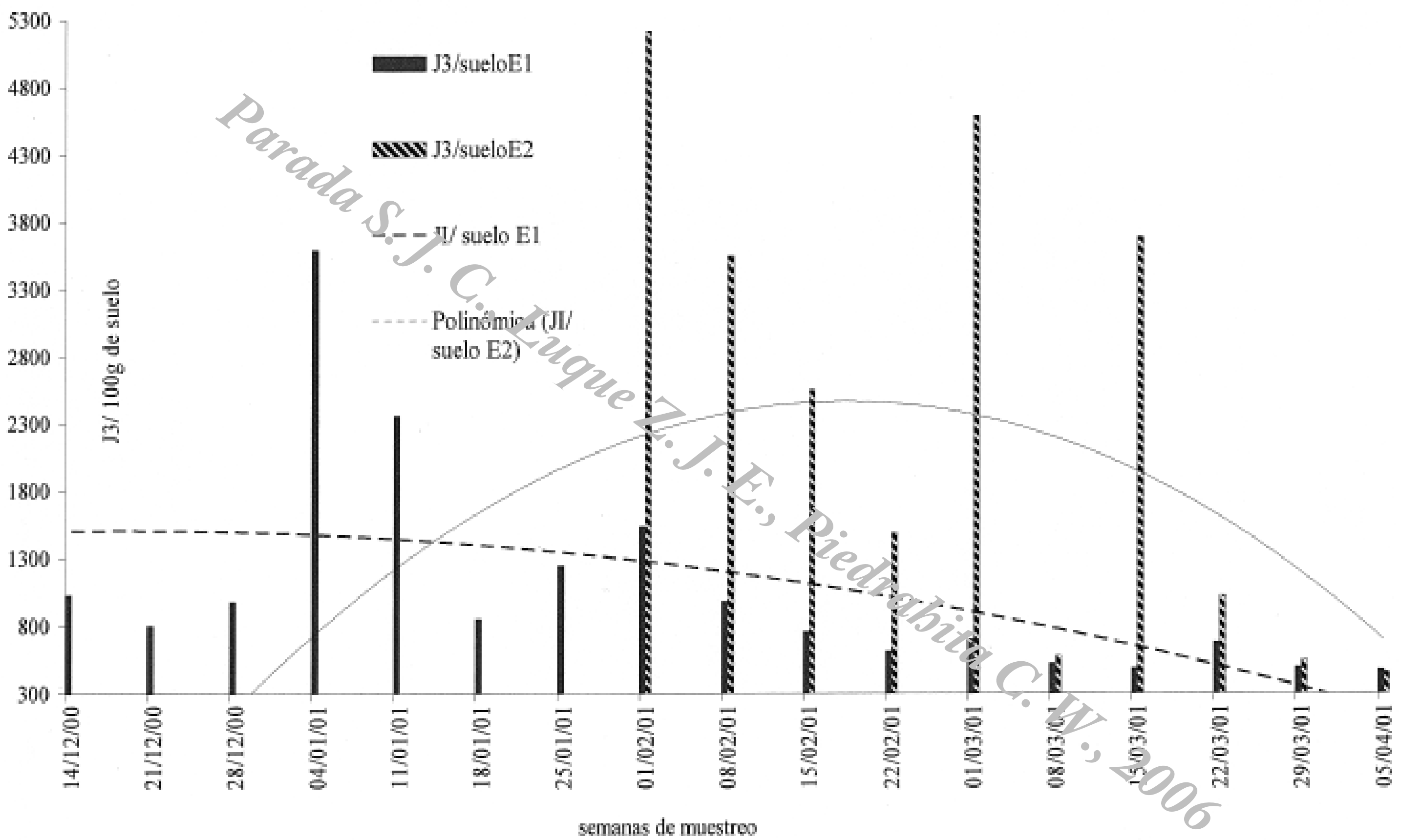
ya que afectan la integridad física de los JI. Teniendo en cuenta que para el primer ciclo se liberaron huevos de *T. solanivora*, además de lo heterogéneo del cultivo, se decidió realizar la primera aplicación (E1) hasta completar un 85% de área aporcada, aproximadamente hacia la novena semana de siembra; la segunda aplicación (E2) se realizó en época de tuberización, aproximadamente 45 días antes de la cosecha. Las liberaciones para el segundo ciclo se cumplieron una semana después del aporque para E1 y 35 días antes de la cosecha para E2.

Sobrevivencia. Luego de analizar muestras de suelo postaplicación, se evidenció disminución en el número de JI a través de la columna de suelo en el tiempo (gráfica 1). En muestras inmediatas a la liberación, se encuentran JI entre los 10 y 15 cm en suelo húmedo, mientras que en las últimas muestras se encontraron JI entre los 30 y 40 cm en suelos más compactados y secos hacia la superficie. Este comportamiento del JI confirma su movilidad en la columna de suelo, pero disminuyó su capacidad supervivencia, dadas las bajas concentraciones de oxígeno a mayores profundidades.

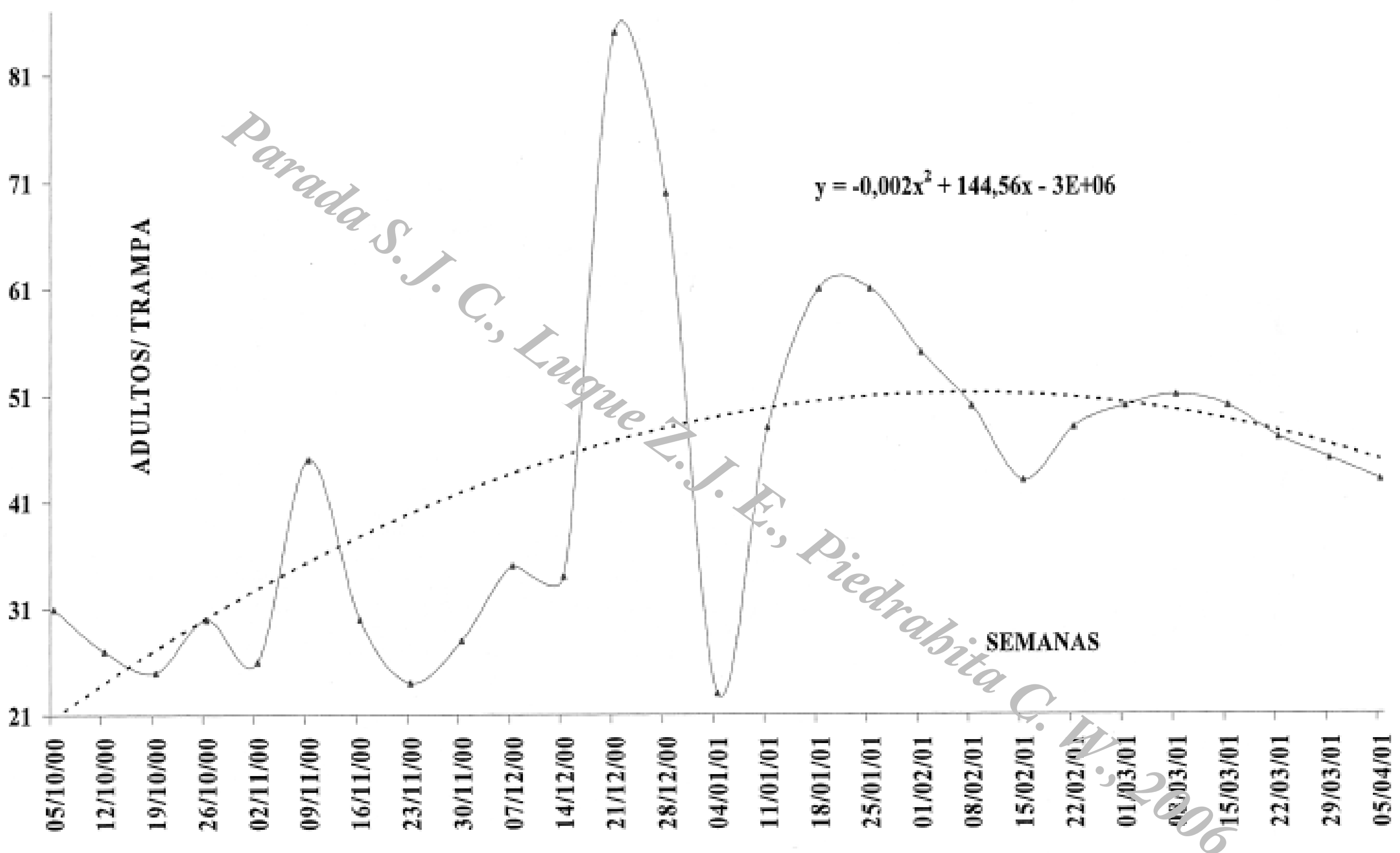
Pruebas de patogenicidad de JI aislados de suelo resultaron positivas sobre larvas de *Achroia grisella*, hasta los 30 días de muestreo; pasado este tiempo la población de JI viva se redujo hasta en un 95%.

Desarrollo y productividad en el ciclo 1

Condición sanitaria. La semilla utilizada mostró un 55% de emergencia a los 35 días de siembra, llegando hasta un 88% hacia los 55 días, lo que ocasionó heterogeneidad de emergencia y discontinuidad e incremento en las labores de desyerbe y aporque, especialmente. Este comportamiento de cultivo permitió la alternancia generacional de insectos defoliadores, que fueron debidamente controlados en los TC con productos convencionales. Hacia el cuarto mes de cultivo se presentaron ataques de babosa, que fueron controlados con manejo



Gráfica 1. Juveniles infectivos recuperados a través de columna de suelo en epoca 1 (E1) y época 2 (E2).



Gráfica 2. Adultos de *T. solanivora* capturados por trampa con feromona.

químico. Las condiciones ambientales de época seca para fin de año, y algunos inconvenientes técnicos para la disponibilidad de riego, posibilitaron el efecto de las heladas, afectando hasta un 55% de follaje en más del 75% del cultivo. Para atenuar tales efectos, se realizaron riegos y aplicaciones de fertilizantes foliares dos veces por semana a todo el cultivo, además de combinaciones urea-melaza, logrando de este modo recuperar el follaje en un 18%, condición que permitió el engrosamiento de los tubérculos.

Comportamiento poblacional de *T. solanivora*. Desde el aporque hasta la cosecha se realizaron 18 muestreos, que mostraron promedios de 50 adultos/trampa, con picos máximos de 85 y 70 adultos/trampa hacia las semanas 13-14, presentando un fuerte declive de la población hacia la semana 16. En promedio, se obtuvieron 23 adultos/trampa. Los muestreos hacia las tres últimas semanas antes de la cosecha presentan en promedio 45 machos/trampa (gráfica 2).

Antes de la cosecha, se evidenciaron ataques de *T. solanivora* y *P. vorax*, principalmente en los testigos absolutos, de manera aislada en los comerciales y en menor proporción en parcelas tratadas con *S. feltiae*.

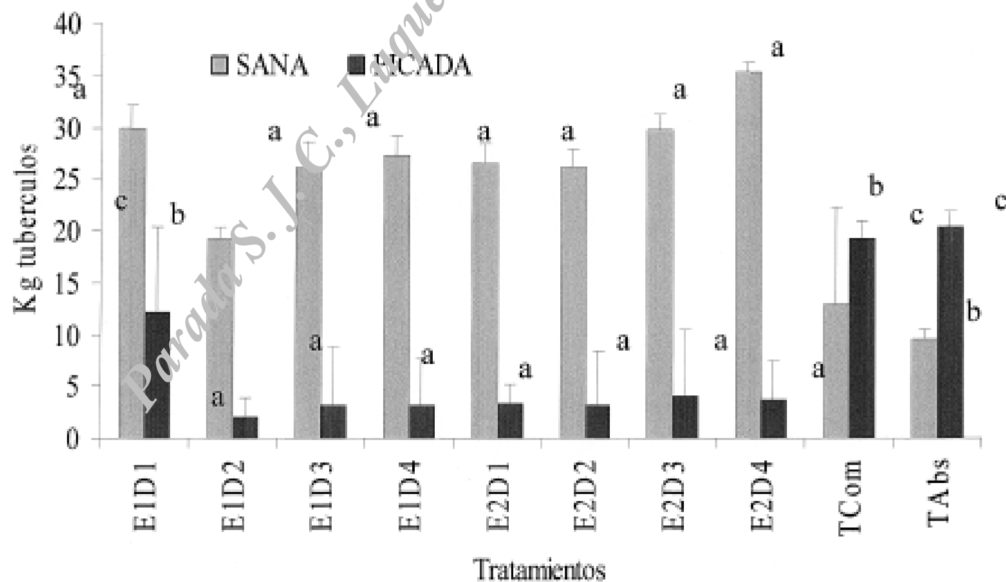
Rendimiento y nivel de daño. En total se obtiene una producción de 978,4 kilogramos, correspondiendo 223,5 kg a tubérculos afectados por *T. solanivora* y 754,9 kg a tubérculos sanos, presentando el máximo rendimiento en tubérculos de segunda (336 kg) y de tercera (291 kg) (tabla 1 y gráfica 3). Según el análisis de varianza (tabla 2), se muestran altas diferencias significativas en el porcentaje de daño total, que se aprecia en la incidencia de los tratamientos sobre los testigos, sus dosis y épocas de aplicación. El mayor rendimiento en los tubérculos de segunda se evidencia en el menor porcentaje de daño y la diferencia significativa encontrada entre bloques, tratamientos vs testigos y entre testigos.

Tabla 1. Producción, en kilogramos, por categoría y porcentaje de daño por tratamiento para ciclo 1 de cultivo. D = dañado; S = sano. Categorías: O = cero, Pr = primera, sg = segunda y ter = tercera. E1 = época 1; E2 = época 2; Tab = testigo absoluto; TC = testigo comercial.

Trat.	DPr	Dsg	Dter	Picada	SPr	Ssg	Ster	Sana	% de Daño
E1D1	0,2	1,2	11,1	12,5	3,1	11,2	11,8	26,1	32
E1D2	0,2	1,8	2,9	4,9	4,8	6,9	11,2	22,9	17
E1D3	0,2	1,5	1,2	2,9	2,3	12,3	9,8	24,4	10
E1D4	0,5	0,9	1,2	2,6	2,1	10,5	10,2	22,8	10
E2D1	0	0,2	0,5	0,7	3	5,7	8,3	17	3
E2D2	1,5	1,2	1,3	4	2,2	10,1	11,9	24,2	14
E2D3	0	1,9	2,3	4,2	11,2	18,2	11,7	41,1	9
E2D4	0,65	2,3	0,2	3,15	3,5	12,4	9,8	25,7	10
TAB	9,7	1,7	9,8	21,2	4,7	1,1	11,7	17,5	54
TC	8,9	10,3	10,5	29,7	4,2	10,7	5,7	20,6	59
E1D1	0,5	2,9	10,8	14,2	9,5	17,2	12,7	39,4	26
E1D2	0,75	1,9	1,7	4,35	4,1	18,3	10,2	32,6	12
E1D3	0	0,5	1,3	1,8	9,7	9,9	7,9	27,5	6
E1D4	1,2	1,5	1,7	4,4	2,6	18,1	10,5	31,2	12
E2D1	1,1	0,5	1,5	3,1	3,6	7,5	9,2	20,3	13
E2D2	0,5	1,8	2,1	4,4	11,5	14,7	16,2	42,4	9
E2D3	0	2,3	1,6	3,9	2,9	10,1	6,8	19,8	16
E2D4	0,7	0	2,4	3,1	12,7	16,2	7,1	36	7
TAB	6,9	6,7	5,8	19,4	0,6	2,3	6,2	9,1	68
TC	3,9	0,9	11,2	16	0,7	2,5	7,7	10,9	59
E1D1	0	0	9,7	9,7	2,1	12,3	9,8	24,2	28
E1D2	0	0	0,3	0,3	2,1	9,6	11,2	22,9	1
E1D3	1,8	2,7	1,1	5,6	5,3	12,8	9,6	27,7	16
E1D4	1,3	0,6	3,7	5,6	2,7	16,1	16,4	35,2	13
E2D1	0	0,2	2,1	2,3	1,4	9,4	9,5	20,3	10
E2D2	0	0	0,9	0,9	2,2	10,8	9,7	22,7	3
E2D3	0,8	0,3	0,1	1,2	2,7	12,3	6,7	21,7	5
E2D4	2,3	0,3	2,1	4,7	7,1	27,3	13,8	48,2	8
TAB	2,9	5,1	12,8	20,8	1,5	6,5	3,1	11,1	65
TC	2,1	2,1	7,7	11,9	0,8	3,1	5,5	9,4	55
TOTAL	223,5				754.9				22%
Producción: 978.4 Kilogramos									

Tabla 2. Análisis de varianza para porcentaje de daño por categoría y daño total en el ciclo de cultivo I. C.V.= coeficiente de variación; Trat = tratamientos; test = testigos.

	% Primera	% Segunda	% Tercera	%Daño Total
Modelo	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
C.V.	54	48	35	23
Bloque	0.79	0.06	0.71	0.62
Trat. Vs Test.	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Testigos	0.99	0.0041	0.72	0.29
Dosis	0.28	0.69	0.0051	0.01
Época	0.92	0.50	0.018	0.008
Dosis*Epoca	0.53	0.97	0.007	0.012
Media	24	16	25	22



Gráfica 3. Rendimiento en calidad de tubérculos picados y sanos por tratamiento.

Desarrollo y productividad en ciclo 2

Condición sanitaria. La semilla usada mostró un 98% de emergencia a los 35 días de siembra y, en términos generales, el cultivo no presentó condiciones patológicas ni de insectos que incidieran sobre su fenología y productividad. Algunos ataques aislados de defoliadores se trataron con productos comerciales de síntesis química, dirigidos principalmente a los TC; tan sólo se realizó una aplicación generalizada de control químico para *P. vorax* en la siembra.

Comportamiento poblacional de *T. solanivora*. La colecta en trampas de feromona de la primera a la quinta sexta después de la primera aplicación mostró rangos entre 50 y 80 adultos/trampa/ semana, manteniéndose aun hasta la época de cosecha. Al inspeccionar el porcentaje de tubérculos afectados por planta en campo, se observó que la incidencia de daño por larvas de *T. solanivora* no sobrepasó el 10%, mientras que *P. vorax* incidió hasta en un 20% en el daño total de las muestras. Hacia la quinta semana de muestreo, el daño por larvas de *T. solanivora* no sobrepasó el 1%, siendo superada por *P. operculella*, que presentó incidencia de hasta un 25% en los tubérculos muestreados.

Rendimiento y nivel de daño. Se obtiene una producción de 3390,9 kilogramos, de los cuales 314 kg corresponden a tubérculos afectados por *P. operculella*, *P. vorax* y *T. solanivora,* y 3076,9 kg a tubérculos sanos, presentando el máximo rendimiento en tubérculos de primera (1478,4 kg) y de segunda (910 kg) (tabla 3 y gráfica 4). El análisis de varianza (tabla 4) no muestra diferencias significativas en porcentajes de daño entre tratamientos, testigos, dosis y épocas de aplicación, tan sólo se aprecian diferencias entre bloques para categorías de primera y tercera, reflejando la variación en rendimiento entre bloques. Los bajos promedios en porcentaje de daño por categoría y total (9%) muestran el alto rendimiento aportado por este ciclo de cultivo.

Tabla 3. Producción, en kilogramos, por categoría y porcentaje de daño por tratamiento para el ciclo 2 de cultivo. D = dañado; S = sano. Categorías: O = cero, Pr = primera, sg = segunda y ter = tercera. E1 = época 1; E2 = época 2; Tab = testigo absoluto; TC = testigo comercial.

Trat	DPr	Dsg	Dter	Picada	SPr	Ssg	Ster	Sana	% Daño
E1D1	1,5	4	1,5	7	51	24	18,5	93,5	6
E1D2	3,5	5	1,5	10	35	21	18,5	74,5	11
E1D3	3,5	4	0,5	8	49	25	26,5	100,5	7
E1D4	10	4,5	1,5	16	59	24	15	98	14
E2D1	3,5	5	1,5	10	33	25	29	87	10
E2D2	2	5,5	1	8,5	55,5	21	18	94,5	8
E2D3	6,5	3,5	0,5	10,5	66	23,5	28	117,5	8
E2D4	14	9	1	24	73,4	44,5	13	130,9	15
TAB	3,5	6,5	1,5	11,5	69	30	25	124	8
TC	12	4	1,5	17,5	86	29	18	133	11
E1D1	4,5	3,5	0,5	8,5	53,5	25	23	101,5	7
E1D2	4,5	4	0,5	9	59,5	50	25	134,5	6
E1D3	1,5	5	0,5	7	59,5	31,5	27	118	5
E1D4	4,5	6	0,5	11	60	25,5	27,5	113	8
E2D1	2,5	4	0,5	7	37,5	48,5	33,5	119,5	5
E2D2	1,5	4,5	0,5	6,5	59	24,5	18	101,5	6
E2D3	4	3,5	0,5	8	56	30	22,5	108,5	6
E2D4	4,5	6,5	1,5	12,5	64	26	28	118	9
TAB	7,5	3	2,5	13	49,5	34	21,5	105	11
TC	3	5,5	0,5	9	68	31,5	24	123,5	6
E1D1	3,5	5	2	10,5	23	41,5	18,5	83	11
E1D2	3,5	4	0,5	8	32	30,5	23	85,5	8
E1D3	2,5	6	0,5	9	26	25	21,5	72,5	11
E1D4	5,5	3,5	1,5	10,5	42	29,5	18,5	90	8
E2D1	5,5	4,5	1,5	11,5	44,5	40,5	34,5	119,5	8
E2D2	3,5	4	1,5	9	30	30	16	76	10
E2D3	3,5	5,5	1,5	10,5	19	23	18,5	60,5	14
E2D4	5	6	1,5	12,5	55,5	33,5	29	118	9
TAB	2	4	0,5	6,5	30	32	32	94	6
TC	6,5	3	2	11,5	33	31	17,5	81,5	12
TOTAL	Tubérculo Dañado 314				Tubérculo Sano 3076.9				Daño 9%
Producción : Kilogramos 3390.9									

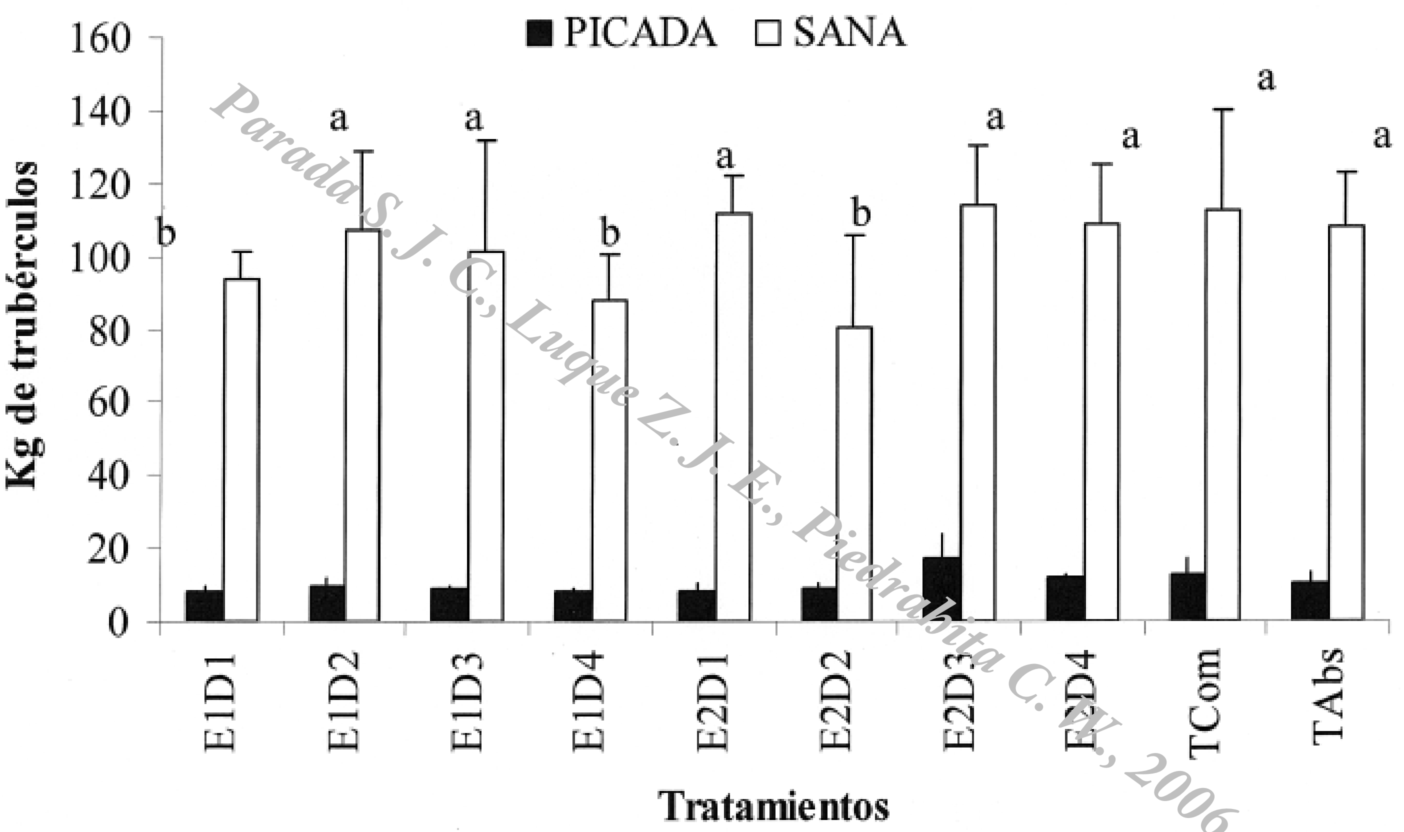
Tabla 4. Análisis de varianza para porcentaje de daño por categoría y daño total en el ciclo de cultivo II. C.V.= coeficiente de variación; Trat = tratamientos; test = testigos.

	% Primera	% Segunda	% Tercera	%Daño Total
Modelo	0.40	0.44	0.35	0.32
C.V.	45	28	59	27
Bloque	0.06	0.14	0.08	0.03
Trat. Vs Test.	0.54	0.22	0.23	0.86
Testigos	0.37	0.90	0.74	0.45
Dosis	0.63	0.31	0.36	0.29
Época	0.66	0.63	0.97	0.64
Dosis*Epoca	0.43	0.67	0.47	0.79
Media	8	13	4	9

Discusión

Teniendo en cuenta los recurrentes ataques y pérdidas ocasionadas por *T. solanivora*, *P. vorax* y *P. operculella* en cultivos de papa localizados en áreas circundantes al área de estudio, los porcentajes de daño para el ciclo 1 (22%) y para el ciclo (29%) resultan bastante alentadores, pues los cultivos vecinos que fueron tratados con más de una aplicación de productos comerciales con ingredientes activos de síntesis química presentaron hasta un 50% de daño (Caro, A., com. pers., 2001). Según lo anterior, se puede asegurar que es técnicamente viable el uso de nematodos parásitos de insectos que atacan la papa.

La alta variación en los rendimientos entre ciclos se debe, en primera instancia, a la diferencia en la calidad de semilla usada para cada uno, lo que no incidió directamente sobre la disponibilidad de tubérculos como fuente alimenticia de *T. solanivora* y otros insectos dañinos. La relativa igualdad en el porcentaje de daño entre los tratamientos para el ciclo 2 respecto al ciclo 1, responde a las diferencias en disponibilidad



Gráfica 4. Rendimiento de tubérculos de primera y segunda, por tratamiento.

poblacional con la que contó el ciclo 1, por la liberación de huevos de *T. solanivora* al cual fue sometido, lo que permitió acción continua y directa de una cohorte poblacional sobre los tubérculos por parte de los estados responsables del daño.

En cuanto al ciclo 2, la disponibilidad de poblaciones naturales, que aparentemente se mostraron altas en trampas de adultos, no coincidió con el número de estados larvales disponibles en suelo, principalmente en lo que se refiere a *T. solanivora*, permitiendo a su vez el ingreso de poblaciones de otros insectos dañinos. Entonces, puede decirse que el ciclo 1 contó con mayor presión poblacional por parte de un número de larvas más constante, y que en el segundo ciclo, cuando ocurrió el traslape poblacional por alternancia generacional, no se contó con un número constante de larvas que ejercieran presión constante sobre los tubérculos, y aunque las poblaciones de adultos se presenten numerosas, no siempre definen la disponibilidad de estados inmaduros en suelo, posiblemente por variación en el comportamiento de cópula y oviposición por efectos climáticos y ambientales (Duncan, 1999), a los cuales los heteroceros son sensibles.

Según Wilson *et al.* (1999), ajustar las dosis y sincronizar las épocas de liberación de nematodos entomoparásitos depende del cultivo y del comportamiento biologico y poblacional del insecto blanco, condición acorde con los resultados obtenidos para las dosis usadas, ya que estadísticamente para este estudio no se muestran evidencias que permitan definir una dosis probablemente óptima de recomendar. Entonces, la patogenicidad de los JI dependió más de su capacidad de desplazamiento y búsqueda que del número de JI liberados, ya que los muestreos de suelo realizados arrojaron registros de JI en suelo con baja a humedad de profundidad media de 10 cm y más húmedos hacia los 40 cm. El encuentro de JI en áreas de suelo de muy baja humedad fue posible sólo cuando éstos infectaron larvas de primero a cuarto instar de *T. solanivora* o *P. vorax,* localizadas dentro de galerías en los

tubérculos. La variación en profundidad de desplazamiento de JI se relaciona con los diferentes porcentajes de daño presentados en las categorías de tubérculos, pues aquellas catalogadas como de primera y segunda, que son algo más profundas, son las que menos daño presentan, mientras que la categoría mas superficial o tercera fue la más afectada. Es claro que a medida que la humedad del suelo disminuye en la superficie, la tendencia de los JI a profundizar es mayor (Gaugler, 1998); para el modelo en discusión ocasiona desprotección de los tubérculos más superficiales. Aunque en condiciones de laboratorio se detectan diferencias de movilidad según el tipo de suelo, temperatura y humedad, es necesario en posteriores estudios conocer la capacidad de movilidad y desplazamiento de los JI en suelo y dentro de tubérculos en condiciones de campo.

En cuanto a épocas de aplicación, se considera que las épocas usadas logran cierto nivel de protección y sincronización con el ingreso de poblaciones de *T. solanivora* y *P. vorax*, ya que es entre el aporque y la cosecha cuando se hace más evidente la disponibilidad de insectos dañinos, coincidiendo con la tuberización y maduración de los tubérculos. Por tal motivo se requerirán trabajos más detallados sobre la distribución espacial y temporal de adultos y larvas, de modo que se logre sincronizar épocas en las que las poblaciones en suelo puedan ser controladas. Los resultados permiten recomendar dos aplicaciones seguidas, una luego del aporque y un refuerzo hacia la cosecha, a fin de garantizar la presencia de JI, ya que la sobrevivencia del nematodo en suelo no sobrepasa los 30 días, además que coincide con el momento en que las poblaciones de larvas de *T. solanivora*, *P. operculella* y *P. vorax* se incrementan en suelo, dada la oferta de fuente alimenticia.

Referencias

CORREDOR, T; PALACIOS, L; PARADA, J.C. 1999. Capacidad de búsqueda de *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) sobre *Tecia solanivora*

(Lepidoptera: Gelechidae) afectando *Solanum phureja* en laboratorio. En: Resúmenes XXVI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. Santafé de Bogotá. 28-30 Julio.

DUNCAN, L.W.; SHAPIRO, D.I.; MCCOY, C.W.; GRAHAM, J.H. 1999. Entomopathogenic Nematodes as a Component of Citrus Root Weevil IPM. En: Optimal use as insecticidal nematodes in pest management, ed. S. Polavarapu, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey. Pp 91-94.

GARZÓN, M.; AZA, B. 1994. Potencial del nematodo (*Steinernema* sp.) para el control biológico del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* (Hust). Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá, D.C. (Tesis Ingeniero Agrónomo).

GAUGLER, R. 1988. Ecological considerations in the biological control of soil-inhabiting insect pests with entomopathogenic nematodes. Agriculture Ecosystems & Environment 24: 351-360.

GREWAL P.S. 1999. Production, Formulation and Quality. En: Optimal use as insecticidal nematodes in pest management, ed. S. Polavarapu, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey. Pp 15-24.

HOMINICK, W.M.; REID, A.P.; BOHAN, D.A.; BRISCOE, B.R. 1996. Entomopathogenic nematodes: biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. Biocontrol Science and Technology 6: 317-331.

PARADA, J.C. 2000. Distribución de *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) (Rhabditida: Steinernematidae) en Cundinamarca, Colombia. En: Resúmenes XXVII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. Medellín-Antioquia. 26-28 Julio.

PARADA, J.C.; SAENZ, A.; LUQUE, E. 1998. Uso de Steinernematidae sobre *Tecia solanivora* (Povolny). En Conclusiones y memorial del talleres "Planeación estratégica para el manejo de *Tecia solanivora* en Colombia" U.N. Santafé de Bogotá.

STOCK S., P. 1998, Sistemática y biología de nematodos parásitos y asociados a insectos de importancia económica, Universidad Nacional de Litoral, Esperanza, Santafé, Argentina. Octubre. Pp 99.

Evaluación de cinco aislamientos de nematodos entomoparásitos, nativos e introducidos, para el manejo de chisas rizófagas (Coleoptera: Melolonthidae) de tercer instar

Elsa Liliana Melo M.*, Carlos Alberto Ortega O.**, Andreas Gaigl**, Anthony C. Bellotti**

Resumen

En estudios de laboratorio, se evaluaron infectivos juveniles de *Steinernema riobravis*, *Heterorhabditis bacteriophora* (Italia), *S. carpocapsae*, *Heterorhabditis* sp., *H. bacteriophora* (Alemania) para conocer su efecto sobre larvas de tercer instar de *Phyllophaga* pos. *bicolor*, *P. menetriesi* y *Anomala cincta* en suelo con 10.000 IJs/larva, evaluadas 10 días después de la infección. Después de este tiempo, para *P.* pos. *bicolor*, los tres aislamientos de *Heterorhabditis* presentan la mayor infectividad, y la mayor mortalidad ocurre con la cepa nativa de este mismo género (>70%). *P. menetriesi* presentó la mayor infección con el aislamiento nativo, sin mostrar diferencias en la mortalidad con todos los aislamientos evaluados, presentando un promedio de 11,46%. *A. cincta* exhibió los mayores valores en infección cuando *Heterorhabditis* sp. fue aplicado; en la mortalidad, el mismo aislamiento junto con el procedente de Italia presentaron los mayores valores (52,08%). Comparando las tres cepas frente a los aislamientos de nematodos, *P. menetriesi* es la cepa más resistente frente a las otras dos y el aislamiento más patogénico fue *Heterorhabditis* sp. (Colombia).

---

* Autor para correspondencia: Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT. A.A. 6713, Cali. Tel.: 445 00 00, fax.: 445 00 73, E-mail: elmelo@hotmail.com

** Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT.

Introducción

Las larvas de escarabajos, conocidas como chisas, son las plagas a nivel del suelo de mayor importancia en diferentes cultivos del mundo. Solamente las larvas de tercer instar causan daños significativos al consumir las raíces de los cultivos, por lo que se las denomina tierreros o trozadores y en las diferentes etapas de desarrollo de los cultivos causan amarillamiento, vaneamiento y volcamiento (Posada, 1993). En Colombia, los ataques de chisas se han generalizado en todas las zonas agroecológicas del país, especialmente en la región andina, en áreas de clima frío y templado, donde se encuentra la agricultura de ladera de los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca, Cauca y Nariño (Posada, 1993; Pardo-Locarno *et al*., 1995).

En los últimos 20 años esta plaga ha ocasionado pérdidas de rendimiento por métodos de cultivo inapropiados, como la quema de residuos de cosecha, deforestación, cultivo de tierras marginales, pérdida de la biodiversidad de controladores y plantas hospederas, reducción de materia orgánica del suelo; y excesiva pero ineficiente aplicación de pesticidas sintéticos utilizados aun por calendario. En ese sentido, existe un alto interés en investigar técnicas de control efectivas que no vayan en contra de la salud humana ni del ambiente, buscando agentes para el control biológico de los rizófagos (Posada, 1993; Londoño, 1994).

El control microbiológico de plagas de la familia Scarabaeidae fue propuesto hace más de 100 años y los programas de control microbial más exitosos están basados en patógenos con alta especificidad hacia plagas precisas (Jackson, 1993). En la actualidad, bacterias, hongos, virus y entomonematodos han sido usados en programas de control biológico, pero el uso de éstos para escarabajos es reducido, limitación que se debe a la carencia de filtrados adecuados, métodos de producción y aplicación indebidos, y su uso incorrecto.
A nivel mundial, varios autores han realizado estudios para el control

de chisas tales como *Popillia japonica, Rhizotrogus majalis, Phyllophaga fusca, P. anxia* y *Poliphilla comes*. Con diferentes especies de nematodos entomoparásitos (nep's) de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae hallaron que su uso es promisorio y su efectividad es mayor cuando las dosis de nep's usadas son altas; además, por la capacidad de reproducción y supervivencia de los nemátodos es posible reducir el número de aplicaciones e incluso eliminar el uso de algunos insecticidas (Villani y Wright, 1988; Forschler y Gardner, 1991; Klein, 1992; Lacey *et al.,* 1993; Gaugler *et al*., 1994).

En el país, en los últimos años, se han realizado investigaciones con especies nativas y foráneas, destacando entre aquellas trabajos para el control de chisas *Ancognata scarabaeioides* (Navarro y Vélez, 1999), y contra *P. obsoleta* y *Cyclocephala* sp. (Londoño, 1999). Esto demuestra el interés en estudiar a estos entomopatógenos mediante metodologías que permitan evaluar, bajo diversas condiciones, su efectividad.Por lo expuesto, el presente estudio se planteó buscando alternativas viables para el control de tres especies de chisas fitófagas, *Phyllophaga menetriesi*, *Phyllophaga* pos. *bicolor* y *Anomala cincta*, evaluando el efecto de cinco cepas de nep's sobre la infectividad y mortalidad de los rizófagos blanco.

Metodología

Este experimento se llevó a cabo en condiciones de laboratorio, en el campo experimental del CIAT, a condiciones controladas (23 +/- 2 °C, 70 +/- 5%) y de total oscuridad.

Especies blanco

Las especies de chisas con las que se trabajó se obtuvieron por capturas en campo, a través de muestreos de campo en la región de Cauca (Caldoso, 1.580 msnm, 18 °C) y Valle del Cauca (Calucé, 1.637 msnm, 20 ºC). Para este experimento se seleccionaron chisas de tercer instar

de tres especies *Phyllophaga menetriesi, Phyllophaga* pos. *bicolor*, (Cauca) y *Anomala cincta* (Calucé). Previo al trabajo en laboratorio, las larvas se mantuvieron en cuarentena para verificar que no estén afectadas por organismos adquiridos en el campo. La cría en laboratorio se mantuvo en una cabina con control de temperatura (19 °C) y humedad relativa (70 +/- 5%), en arena y suelo orgánico estéril (1:3), contenida en vasos plásticos con tapa, con capacidad volumétrica de 100 ml. Los organismos fueron alimentados con trozos de zanahoria, de aproximadamente 6 cm^3 (2,0 x 2,0 x 1,5 cm).

Nematodos

Se evaluaron cinco aislamientos de nep's, entre nativos e introducidos (tabla 1), los que se multiplicaron para cada experimento en larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), una semana antes de la aplicación, siendo mantenidos dentro de agua destilada estéril en incubadora a 15 °C hasta su uso.

Diseño experimental

El experimento se implantó en un diseño experimental completamente al azar (DCA), considerando dos factores en estudio: uno por las cinco cepas de nep's, y el otro por las tres especies de chisas. Se empleó un testigo absoluto de chisas sin ninguna aplicación, y un testigo atípico

Tabla 1. Cepas de nematodos entomoparásitos evaluadas para el manejo de tres especies de chisas rizófagas.

Especie de nematodo	Procedencia		Fecha /arribo	Colector
	País	Inst.		
Steinernema riobravis	EUA	Certis	Ene - 2003	Certis
*Heterorhabditis bacteriophora*1	Italia	CABI/Bioscience	2002	López
Steinernema carpocapsae	EUA	CABI/Bioscience	2002	López
Heterorhabditis sp.	Colombia	Cenicafé	2002	López
*Heterorhabditis bacteriophora*2	Alemania	E-nema	Jun - 2003	Ehlers

de G. mellonella en arena, como un control de infectividad de las cepas de nep's. Se trabajó con 12 individuos y cuatro repeticiones, empleando una dosis de 10.000 IJs/por larva. La unidad experimental consistió de un vaso plástico (capacidad 56 ml), con tapa, con suelo:arena estéril (3:1), donde se aplicó 1 ml de la solución y 3 ml de agua destilada estéril para ajustar la humedad a capacidad de campo. Para el experimento se aplicaron los nep's un día después de depositar la especie de chisa con zanahoria en cada envase. Las unidades se introdujeron en bolsas plásticas negras para evitar la pérdida de humedad, así como la luz, y se mantuvieron en una cabina en condiciones controladas.

Análisis estadístico

Se hizo un análisis de varianza (ANAVA) con separación de medias (Tukey P = 0,05) para las variables significativas (Infostat, 2006). Previo al análisis se realizó una transformación utilizando la fórmula $\sqrt{x+0,5}$ al presentarse valores cero; sin embargo, para la presentación de las gráficas se utilizaron los porcentajes originales.

Se evaluó el porcentaje de infección y mortalidad disectando los

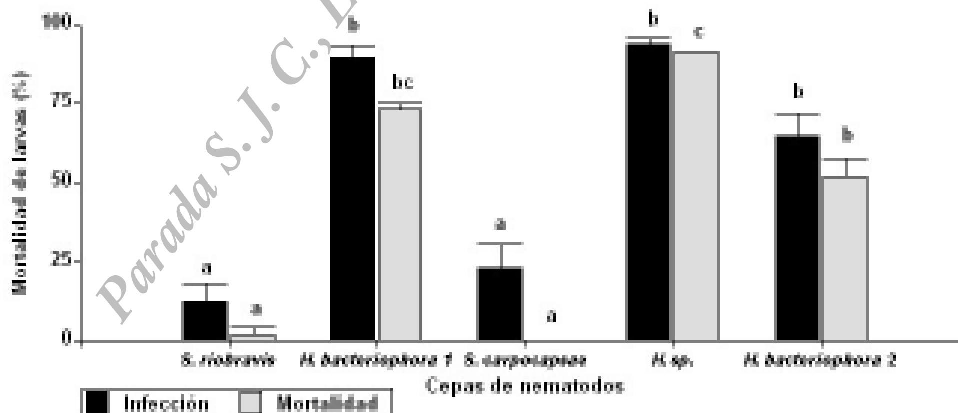


Figura 1. Porcentaje de infección y mortalidad de cinco cepas de nep's (10.000 IJs/ml) sobre tercer instar de la especie de chisa *Phyllophaga* pos. *bicolor*. *H. bacteriophora* 1 (Italia); *H. bacteriophora* 2 (E-nema). Letras iguales no difieren significativamente (P = 0,005).

individuos de cada especie de chisa (vivos y muertos) bajo el estereoscopio. En el control de infectividad de todas la cepas de nep's sobre *G. mellonella* se evaluaron las larvas muertas de ésta colocándolas en trampa White modificada para recuperar los nep's.

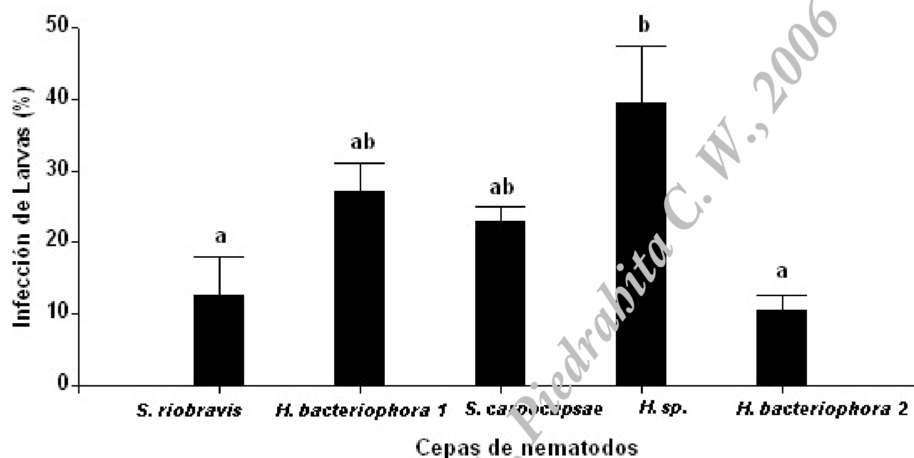


Figura 2. Porcentaje de infección y mortalidad de cinco cepas de nep's (10.000 IJs/ml) sobre tercer instar de la especie de chisa *Phyllophaga menetriesi*. *H. bacteriophora* 1 (Italia); *H. bacteriophora* 2 (E-nema). Letras iguales no difieren significativamente (P = 0,005).

Resultados

En la figura 1 se aprecia que las mayores infecciones sobre *P.* pos *bicolor* ocurrieron con las cepas de *Heterorhabditis* sobre las de *Steinernema* (F = 14,78; gl = 4; P = 0,0001). La mortalidad fue mayor con la cepa nativa de Cenicafé, hallándose muy cercano la otra cepa de Italia, superando el 70% de infección (F = 190,93; gl = 4; P = 0,0001).

En *P. menetriesi* se observaron porcentajes de infección más bajos que para *P.* pos. *bicolor* (27 al 40%), incluyendo a *S. carpocapsae* (figura 2) (F = 4,54; gl = 4; P = 0,0183). Igualmente, la mortalidad estuvo bastante baja para todas las especies, sin presentar diferencias. La especie *Anomala cincta* presentó mejores respuestas al ataque de

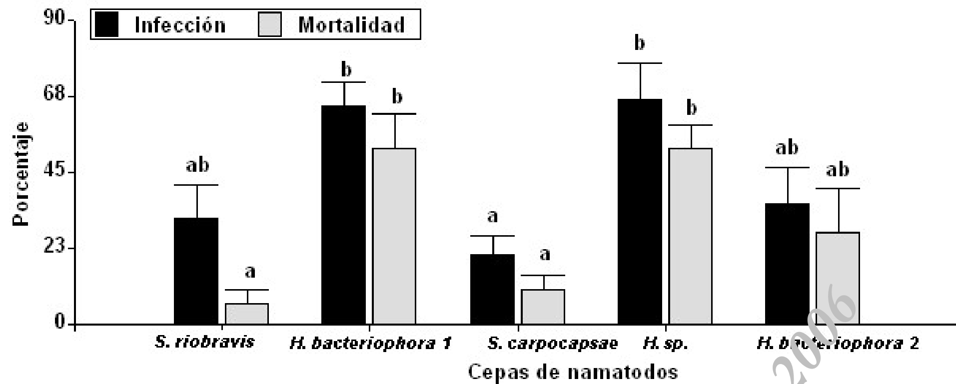


Figura 3. Porcentaje de infección y mortalidad de cinco cepas de nep’s (10.000 IJs/ml) sobre tercer instar de la especie de chisa *Anomala cincta*. *H. bacteriophora* 1 (Italia); *H. bacteriophora* 2 (E-nema). Letras iguales no difieren significativamente (P = 0,005).

nep’s que el rizófago anterior, siendo las mismas cepas (*Heterorhabditis*), las más promisorias, el aislamiento nativo presentó la mayor infección diferenciándose de los otros dos aislamientos del mismo género, los cuales comparten rangos con la especie *S. riobravis* (F = 4,33; gl = 4; P = 0,0214); las mayores mortalidades se presentaron

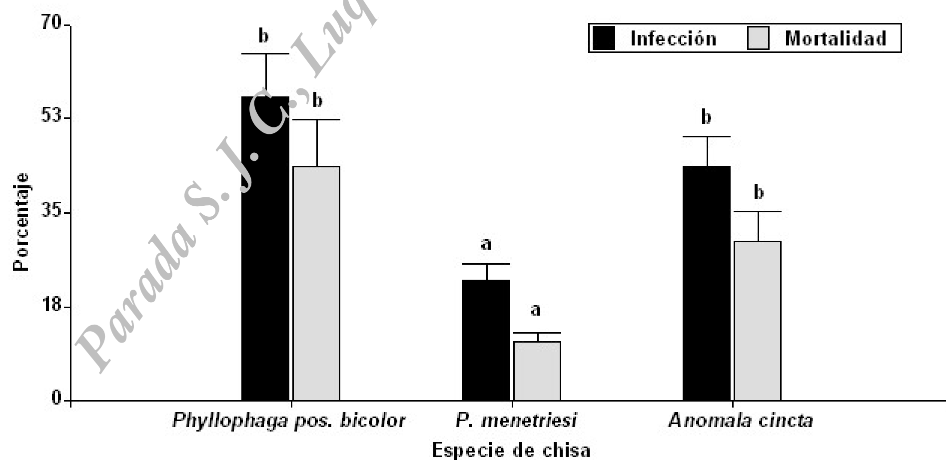


Figura 4. Porcentaje de infección y mortalidad para tres especies de chisas rizófagas (*Phyllophaga* pos. *bicolor, P. mentriesi y Anomala cincta*) con cinco cepas de nep´s (*Steinernema riobravis*, *Heterorhabditis bacteriophora* 1 (Italia), *S. carpocapsae*, *H.* sp. (Cenicafé), *H. bacteriophora* 2 (E-nema). Letras iguales no difieren significativamente (P = 0,005).

con el mismo aislamiento nativo, comportándose igual el aislamiento importado de Italia (*H. bacteriophora* 1); éstas superan el 50% de mortalidad (F = 8,89; gl = 4; P = 0,0014) (figura 3).

Cuando se evaluó el efecto de cinco aislamientos frente a las tres especies de chisas, se encontró que, *P. menetriesi* mostró mayor resistencia a ser infectada por los aislamientos de los nep's que los otros dos rizófagos (F = 14,76; gl = 4; P = 0,0001); la mortalidad producida por los nep's del estudio (44% en *P*. pos. *bicolor*, 30% en *A. cincta* y 11% en *P. menetriesi*) fue menor siempre para este rizófago (F = 190,91; gl = 4; P = 0,0001), lo que corrobora lo observado anteriormente y que podría atribuirse a que presenta una alta defensa contra dichos patógenos (figura 4).

Al comparar el comportamiento de cinco cepas de nep's frente a las tres especies de chisas estudiadas, se confirmó lo observado separadamente con cada especie de chisa: las cepas *H. bacteriophora* de Italia y *H.* sp. de Cenicafé fueron las mejores en la producción de infección; para la mortalidad el aislamiento nativo presentó el mayor valor, lo que la hace promisoria para continuar los estudios, dándole además la ventaja por ser nativa (figura 5).

En la incidencia de nematodos en *G. mellonella* se observó mortalidad

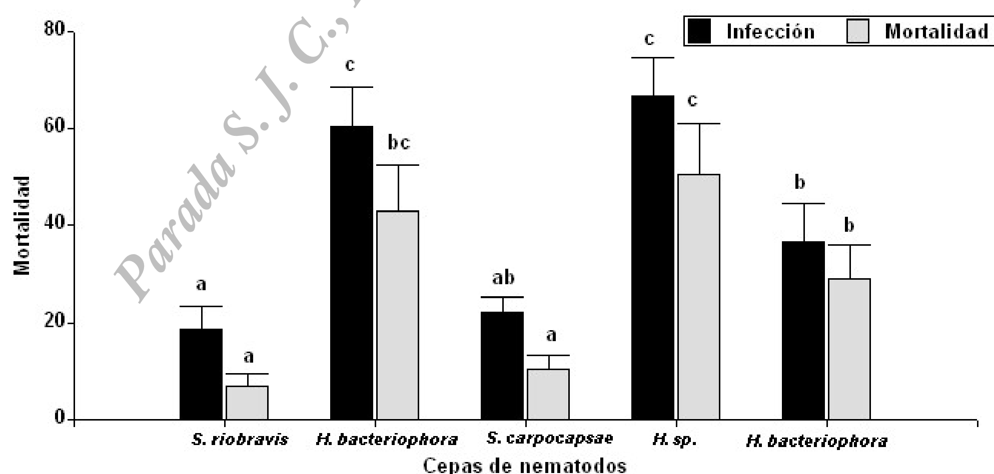


Figura 5. Comportamiento de cinco cepas de nep's frente a la infección y mortalidad total de tres especies de chisas rizófagas (*Phyllophaga* pos. *bicolor, P. mentriesi y Anomala cincta*). Letras iguales no difieren significativamente (P = 0,005).

de larvas a las 48 horas, recuperándose nematodos en todas ellas al usar la trampa White modificada.

Para *Phyllophaga* pos. *bicolor* las cepas *H. bacteriophora* de Italia y *Heterorhabditis* sp. de Cenicafé fueron las más infectivas, produciendo la mayor mortalidad y compartiendo rango estadístico con *H. bacteriophora* E-nema.

Heterorhabditis (*H. bacteriophora* de Italia y *Heterorhabditis* sp. de Cenicafé) fueron las mejores en las variables infección y mortalidad sobre *A. cincta,* la especie de chisa menos agresiva.

La especie *P. menetriesi* fue la más resistente al ataque de los nep's estudiados. Esto coincide con la agresividad observada en la naturaleza al causar el mayor daño a gran cantidad de cultivos en el sur y centro del país. Lo anterior mantiene hasta el momento la necesidad de continuar la búsqueda de alternativas eficientes para el manejo de este rizófago, comenzando con evaluar el efecto de los nep's sobre otros estados de desarrollo de la plaga, en la hipótesis de que sean más vulnerables que el tercer ínstar.

Al comparar el efecto de las diferentes cepas con las tres especies de chisas, las cepas *H. bacteriophora* de Italia y *Heterorhabditis* sp. de Cenicafé siempre se destacaron sobre las demás evaluadas en todo el experimento.

Referencias

FORSCHLER, T.B.; GARDNER, A.W. 1991. Field efficacy and persistence of entomogenous nematodes in the management of white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) in turf and pastures. Journal Economic Entomology 84 (5): 1454-1459.

GAUGLER, R.; WANG, Y.; CAMPBELL, J.F. 1994. Aggressive and evasive behaviors

in *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae: defenses against entomopathogenic nematode attack. Journal of Invertebrate Pathology 64: 193-199.

INFOSTAT. 2006. Manual del usuario. Grupo INFOSTAT, FCA., Universidad Nacional de Córdoba. 1 ed. Editorial Brujas Argentina. 318 p.

JACKSON, T.A. 1993. Developing microbial controls for scarab pest. En: Diversidad y manejo de plagas subterráneas. Memorias de la IV Mesa Redonda sobre Plagas Subterráneas, 14 y 15 de Octubre de 1993, Instituto de Ecología, AC. Xalapa, Veracruz, México. Sociedad Mexicana de Entomología, AC. Instituto de Ecología, AC. 261 p.

KLEIN, M.G. 1992. Use of *Bacillus popilliae* in Japanese beetle control. En: T.A. Jackson and T.R. Glare (Editors), Use of pathogens in scarab pest management. Intercept, Andover. Pp. 179-190.

LACEY, L.A.; BETTENCOURT, R.; GARRETT, F.J.; SIMÕES, N.J.; GAUGLER, R.H. 1993. Factors influencing parasitism of adult Japanese beetles, *Popilliae japonica* (Col.: Scarabaeidae) by entomopathogenic nematodes. Entomophaga 38 (4): 501-509.

LONDOÑO, M. 1999. Efecto de *Steinernema carpocapsae* sobre especies de chiza en Colombia. Memorias, II Seminario sobre Nematodos Entomopatógenos, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. Bogotá. Pp. 54-65.

LONDOÑO, M. 1994. Informe Realizaciones (CORPOICA). Investigación y Desarrollo Tecnológico. CORPOICA. 4 p.

NAVARRO, F.; VÉLEZ, I. 1999. Evaluación patogénica del nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* sobre la chisa *Phyllophaga* sp., en el oriente antioqueño. Memorias, II Seminario sobre Nematodos Entomopatógenos, Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Pp. 37-47.

PARDO-LOCARNO, L.C.; FRANCO, M.P.; ALARCÓN, A.A. 1995. Estudios preliminares de las chisas (Coleoptera: Lamellicornia) de San Antonio, Cauca. Registros y observaciones en Laparosticti y Pleurosticti. Revista Colombiana de Entomología 21 (1): 51-57.

POSADA, F.L. 1993. Las chisas, sus enemigos naturales y recomendaciones sobre su manejo. Agricultura Tropical. 30(3): 71-79.

VILLANI, M.G.; WRIGHT, R.J. 1988. Entomogenous nematodes as biological control agents of European chafer and Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae infesting turfgrass. Journal Economy Entomology 81

Evaluación se *Steinernema feltiae,* cepa Colombia, escalado por fermentación sobre *Tecia Solanivora*, en condiciones de cultivo[1]

Leguízamo B. M.[*], Parada J. C[**] y Piedrahita W.[***]

Resumen

Se valoró la capacidad parasítica de los juveniles infectivos de *Steinernema feltiae,* cepa Colombia, escalado por fermentación en medios sólido y líquido obtenidos en condiciones de campo, sobre estados inmaduros de *Tecia solanivora*. En los tratamientos con nematodos logró más de un 40% de prevención del daño en cultivo de *Solanum phureja*, respecto al manejo químico tradicional. No se presentaron diferencias significativas entre nematodos producidos *in vivo* respecto a los escalados en fermentación sólida y líquida.

Introducción

Con la expansión comercial de los nematodos entomoparásitos, la susceptibilidad de muchos insectos de importancia económica ha sido probada en un amplio rango de ensayos de laboratorio. Sin embargo, determinar su capacidad de control sólo es posible bajo condiciones cultivo. Desde los años 70, en Estados Unidos y la Unión Europea el uso de *S. feltiae* viene incrementándose como controlador biológico de plagas que habitan el suelo. Actualmente, constituye cerca del 5% de la producción mundial de nematodos entomoparásitos (Grewal, 1999).

---

[1] Proyecto Conciencias-Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Código 1101-07-14930. Contrato 475-2003.
[*] Ingeniera Agrónoma, M. Sc., suelos y aguas, estudiante Ph. D., escuela de posgrado U. N., sede Palmita Valle-Colombia, mcleguizamob@unal.edu.co
[**] insectsyco@icqmail.com
[***] wpiedrahitac@unal.edu.co

En Colombia, el registro de poblaciones nativas de esta especie con patogenicidad sobre larvas de plagas en papa como *T. solanivora* (Parada *et al.*, 1998; Corredor *et al.,* 1999), *P. operculella* (Parada, 2004) y *P. vorax* (Garzón y Aza, 1994; Parada, 2004), muestra su potencial como alternativa de control biológico dentro de programas de manejo integrado de insectos en suelos, pero a su vez surge la necesidad de desarrollar métodos de producción masiva y de formulaciones de alta eficiencia en campo, a fin de confirmar su realidad de uso por parte de cultivadores en el ámbito nacional y del área andina.

Metodología

La evaluación se realizó sobre un cultivo de *Solanum phureja*, en el Centro Agropecuario Marengo, de la Universidad Nacional de Colombia, en Mosquera- Cundinamarca, área de altos índices de infestación por *T. solanivora*. Los procedimientos básicos del ensayo se ajustaron a un diseño de bloques completos al azar con 8 tratamientos y 8 repeticiones, dos testigos, sin control y control químico. Se cultivaron 2.432 tubérculos de *S. phureja*, variedad "Yema de Huevo". La unidad experimental constó de dos surcos a un metro de distancia y seis metros de largo, con un total de 38 plantas, dentro de un área total de siembra de 768 m^2.

Tratamientos

(T1) surcos tratados con nematodos procedentes de cultivo *in vivo* sobre *G. mellonella* y *T. solanivora*; (T2) nematodos procedentes de cultivo solidó y (T3) nematodos procedentes de cultivo en medio líquido. Por parcela, se mantuvo un testigo absoluto (Ta) que no recibió ningún tipo de tratamiento contra *T. solanivora* y *Premnotrypes vorax*; y un testigo relativo (Tr) cuyas plantas fueron tratadas con insecticida comercial Curacrón® 500 EC, en dosis de etiqueta, de uso común contra *T. solanivora* y *P. vorax* en cultivo de papa en la sabana. De otra

parte, a fin de garantizar la presencia de larvas de *T. solanivora* en las plantas, se liberaron 200 huevos/planta, en época de desyerba y prefloración. Algunas enfermedades propias del cultivo, como "gota" causada por *Phytophtora infestans*, se controlaron con productos comerciales como Mancozeb®, en dosis de 2,5 kg/ha.

Épocas de aplicación

Por cada tratamiento, se liberaron directamente hacia la base de la planta 10.000 JI/ planta, con fumigadora de palanca LhauraVet® dotada con boquilla de cono hueco tipo TX4. Las aplicaciones se realizaron 10 días después de la desyerba y 15 después de floración. Para el testigo relativo se hicieron dos aplicaciones del insecticida Curacron®, en las dosis de etiqueta, en las dos épocas de aplicación del nematodo.

Resultados y discusión

La semilla usada mostró un 95% de emergencia a los 15 días de siembra. El cultivo fue tratado de manera generalizada con los fertilizantes 13-26-6, 20 g/planta y el foliar Tottal®. Se realizaron labores de desyerbe a los 30 días después de la siembra y un aporque a los 60 días. En las condiciones fitosanitarias del cultivo, hubo un ataque del defoliador *Epitrix* sp. hacia la segunda semana de emergencia de las plantas, y principalmente incidencia del hongo *Phytophtora infestans* tres semanas después de la emergencia y 20 días antes de la cosecha.

El insecto se controló con una aplicación generalizada del producto comercial Furadan® y para "gota" se asperjó todo el cultivo con el producto comercial Manzate® 50g/bomba de 20 litros. Se obtuvo una producción total de 693,751 kilogramos de papa, de los cuales 86,371k corresponde a tubérculos afectados principalmente por *T. solanivora* y de modo secundario por *Phylophaga* sp. y *P. vorax*, eventualmente. Por época de aplicación, la liberación de nematodos a los 10 días después de desyerba produjo 293,45 kg de tubérculos sanos y 29,885 kg de

picados; a los 15 días de floración se produjeron 269,24 kg de tubérculos sanos y 28,996 kg de tubérculos picados (tabla 1).

Tabla 1. Promedios de producción en kg, por tratamientos. Desv = desviación estándar; T1 = JI cultivo *in vivo*; T2 = JI cultivo sólido; T3 = JI cultivo líquido; T4 = tratamiento químico; T0 = testigo absoluto; a = aplicación 10 días después de desyerba; b = aplicación a los 15 días de floración.

Tratamientos	Tubérculos (kg)			
	Sanos		Picados	
	media	desv	media	desv
T0	5.58	0.45	3.43	0.36
T1	9.39	1.12	0.58	0.34
T2	9.28	1.64	0.49	0.29
T3	9.08	1.20	0.57	0.36
T4	7.45	1.44	1.99	0.55
Épocas				
a	9.10	1.80	0.90	0.85
b	8.50	1.20	0.92	0.62
Tratamiento * Época				
T1a	9.84	0.93	0.42	0.29
T1b	8.94	1.17	0.74	0.33
T2a	9.78	1.97	0.52	0.27
T2b	9.78	1.97	0.52	0.27
T3a	9.59	1.14	0.50	0.37
T3b	8.57	1.11	0.64	0.36
T4a	7.18	1.66	2.16	0.71
T4b	7.72	1.25	1.82	0.31

Según análisis de varianza (tabla 2), se registran diferencias significativas entre parcelas (repeticiones), tratamientos y épocas para producción de tubérculos sanos, y entre parcelas y tratamientos para tubérculos picados. La variable época y la interacción época*tratamientos no presentan diferencias significativas para tubérculos picados.

Tabla 2. Análisis de varianza para variables papa sana (S) y picada (P).

Fuente de variación	G. L.	F		Pr > F	
		S	P	S	P
Modelo	15	7.11	30.9	<.0001	<.0001
Parcelas	7	3.96	4.22	0.0017	0.0011
Tratamientos	3	8.67	49.25	0.0001	<.0001
Epocas	1	3.72	0.02	0.05	0.88
Trat*Epoca	3	1.51	1.86	0.22	0.14

Los promedios de producción de tubérculos sanos y picados entre tratamientos presentan diferencias significativas (gráfica 1a). Los promedios de tubérculos entre tratamientos con nematodos sanos 9,23 y picados 0,29, respecto al tratamiento químico 7,47 en sanos 2,02 en picados, y 5,58 en sanos y 3,43 en picados, confirman el efecto de los tratamientos con nematodos en la protección de tubérculos dentro del cultivo (tabla 3).

Aunque los tratamientos en las dos épocas no presentan diferencias estadísticas significativas, sí se advierte en ambas épocas se presentaron mayores promedios de producción de tubérculos en los tratamientos con nematodos, respecto al tratamiento químico, que acentúa el promedio de material picado hacia la primera época de las aplicaciones (gráfica 1b). Los promedios de tubérculos entre tratamientos con nematodos de cultivo *in vivo* y cultivados en proceso de fermentación no muestran valores estadísticos significativos, lo que asegura que los procedimientos usados en las producciones fermentadas procuran material de buena calidad en morfología y capacidad parasítica sobre insectos en condiciones de campo.

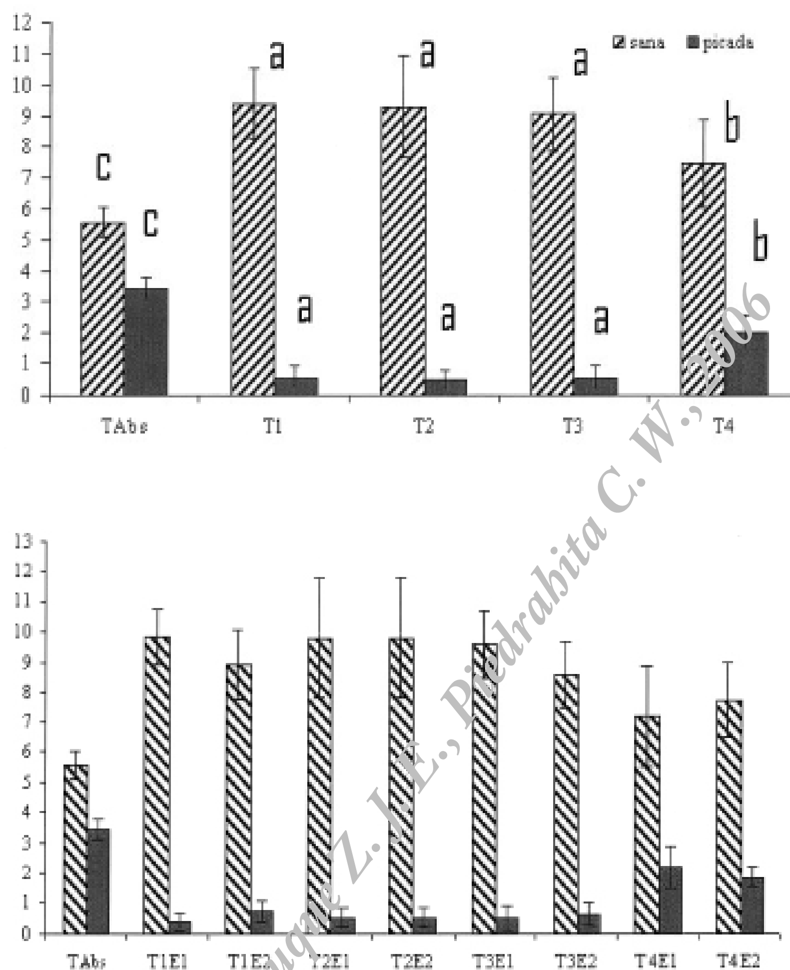
Al analizar, en los tubérculos atacados por *T. solanivora* en los tratamientos con nematodos fermentados se evidenció el parasitismo de los JI sobre larvas de segundo y tercer instar de larvas de *T. solanivora*, dentro de las galerías en los tubérculos. Como caso

Tabla 3. Comparación en promedios de producción de tubérculos sanos y picados entre tratamientos. T1 = JI cultivo in *vivo*; T2 = JI cultivo sólido; T3 = JI cultivo liquido; T4 = tratamiento químico; TAbs = testigo absoluto. Comparaciones con nivel de significancia al 0,05 son indicadas con asterisco (*), según el rango estandarizado de Tukey´s.

Tratamientos comparados	Diferencia entre medias	
	Sanos	Picados
T1: T2	0.10	0.085
T1: T3	0.31	0.007
T1: T4	1.9*	-1.41*
T1: TAbs	3.8*	-2.85*
T2: T1	-0.10	0.08
T2: T3	0.20	0.07
T2: T4	1.82*	-1.49*
T2: TAbs	3.70*	-2.93*
T3: T1	-0.31	0.007
T3: T2	-0.20	0.07
T3: T4	1.62*	1.41*
T3: TAbs	3.49*	-2.86*
T4: T1	-1.93*	1.41*
T4: T2	-1.82*	1.49*
T4: T3	-1.62*	1.41*
T4: TAbs	1.87*	1.44*

excepcional, se encontró una larva de tercer instar de *Phyllophaga* sp. parasitada por JI de *S. feltiae.*

Teniendo en cuenta los recurrentes ataques y pérdidas ocasionadas por *T. solanivora*, *P. vorax* y *P. operculella* en cultivos de papa localizados en áreas circundantes al área de estudio, los porcentajes de daño del 12,41% resultan bastante alentadores, ya que cultivos tratados sólo con nematodos *in vivo* por Luque y Parada (2002) mostraron valores de daño del 30%. De igual manera, históricamente los cultivos comerciales en la zona que han sido tratados con más de una aplicación de productos comerciales con ingredientes activos de síntesis química, han presentado hasta un 50% de daño, permitiendo asegurar entonces



Gráfica 1. Promedios de producción de tubérculos sanos y picados por tratamiento (a) y tratamientos por época (b) en K, de tubérculos por parcela en tratamientos. T1 = JI cultivo *in vivo*; T2 = JI cultivo sólido; T3 = JI cultivo líquido; T4 = (Tr) tratamiento químico; TAbs = testigo absoluto; E1 = aplicación 10 días después de desyerba; E2 = aplicación 15 días de floración; a, b, c = análisis de medias en prueba de rango múltiple de Duncan, barras con la misma letra no presentan diferencias significativas.

que el uso de juveniles infectivos de *S. feltiae*, escalados por fermentación, es técnicamente viable.

Se considera que las épocas usadas logran cierto nivel de protección y sincronización con el ingreso de poblaciones de *T. solanivora* y *P. vorax*,

ya que es entre el aporque y la cosecha cuando se hace más evidente el efecto de insectos dañinos, coincidiendo con la tuberización y maduración de los tubérculos. Por tal razón, se hacen necesarios trabajos más detallados sobre la distribución espacial y temporal de adultos y larvas, de modo que se logre sincronizar épocas en las que las poblaciones en suelo puedan ser controladas. Los resultados permiten recomendar dos aplicaciones seguidas, una luego del aporque y un refuerzo hacia la cosecha, a fin de garantizar presencia de JI, ya que la sobrevivencia del nematodo en suelo no sobrepasa los 30 días, además de que es cuando las poblaciones de larvas de *T. solanivora, P. operculella* y *P. vorax* se incrementan en suelo, dada la oferta de fuente alimenticia.

Ajustar las dosis y sincronizar las épocas de liberación de nematodos entomoparásitos depende del cultivo y del comportamiento biológico y poblacional del insecto blanco (Kaya y Koppenhofer, 1999), condición acorde a los resultados obtenidos para las dosis usadas, ya que estadísticamente para este estudio no se muestran evidencias que permitan definir una dosis probablemente óptima de recomendar; sin embargo, el evaluar las épocas de aplicaciones de modo no independiente mejoraría los resultados, ya que los niveles de control encontrados dependió más de la capacidad de desplazamiento y búsqueda que del número de JI liberados.

Referencias

CORREDOR, T; PALACIOS, L; PARADA, J. 1999. Capacidad de búsqueda de *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) sobre *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechidae) afectando *Solanum phureja* en laboratorio. En: Resúmenes XXVI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. Santa fe de Bogotá. 28-30 Julio.

GARZÓN, M.; AZA, B. 1994. Potencial del nematodo (*Steinernema* sp.) para el control biológico del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax*

(Hust). Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá, D.C. (Tesis Ingeniero Agrónomo).

GREWAL, P.S. 1999. Production, Formulation and Quality. En: Optimal use as insecticidal nematodes in pest management, ed. S. Polavarapu, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey. Pp 15-24.

KAYA, H.K.; KOPPENHOFER, A.M. 1999. Biology and ecology of insecticidal nematodes. En Optimal use of insecticidal nematodes in pest management. Ed. S. Polavarapu, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey – USA. Pp. 1-8.

LUQUE E.; PARADA J.C., 2002 Pruebas de laboratorio y campo para la evaluación de la capacidad patogénica y de establecimiento del entomonematodo *Steinernema feltiae* (Rabditida: Steinernematidae), para el control biológico de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae), Informe Final Proyecto CEVIPAPA IV, Colciencias, Cevipapa, Facultad de Agronomía, 50 p.

PARADA, J.C.; SÁENZ, A.; LUQUE, E. 1998. Uso de Steinernematidae sobre *Tecia solanivora* (Povolny). En Conclusiones y memorial del talleres "Planeación estratégica para el manejo de *Tecia solanivora* en Colombia" Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá.

PARADA J.C. 2004. *Steinernema feltiae* (Rhabdita: Steinernematidae) modelo de investigación en nematodos entomoparásitos. Memorias XXXI Congreso SOCOLEN, Bogotá, D. C., Julio 28-30. Pp. 207-209.

Parasitismo de dos cepas de entomonematodos, una nativa (*Steinernema feltiae*, cepa Colombia) y otra introducida (*Heterorhabditis bacteriophora* cepa E-Nema®), sobre los seis estados de desarrollo de *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Heteroptera: Cydnidae) en condiciones de laboratorio

Elsa Liliana Melo M.*, Carlos Alberto Ortega O.**, Andreas Gaigl**, Ralf-Udo Ehlers***, Anthony Bellotti**

Resumen

El chinche de la viruela, *Cyrtomenus bergi*, es una plaga que ataca las raíces de muchos cultivos, ocasionando grandes pérdidas. Ensayos de laboratorio mostraron cómo al aumentar la edad del insecto la susceptibilidad a los nematodos se incrementa. El primero, segundo y tercer instar son más resistentes a la infección y mortalidad que el cuarto, quinto y adulto, sin presentar diferencias entre los aislamientos evaluados (*Steinernema feltiae* y *Heterorhabditis bacteriophora*). Estos efectos, comparados con otros obtenidos con anterioridad, muestran que los resultados no se pueden generalizar para todas las cepas o estados de la plaga.

Introducción

El chinche subterráneo de la viruela *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae) es una plaga chupadora polífaga que se ha reportado causando daño en cultivos de yuca (*Manihot esculenta*

* Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT. A.A. 6713, Cali. Tel.: 445 00 00, fax.: 445 00 73, e-mail: meloelsa@gmail.com

** Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT.

*** Ph.D. Instituto de Fitopatología, Departamento de Biotecnología y Control Biológico, Universidad de Kiel, Klausdorfer Straße 28-26, 24223 Raisdorf, Alemania.

Crantz), maíz (*Zea mays* L.), maní (*Arachis hypogaea* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), cebolla (*Allium fistulosum* L. y *Allium cepa* L.), palma africana (*Elaeis guinensis* Jacq.), café (*Coffea arabiga* L.), caña de azúcar (*Sacharum officinarum*), fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.), arveja (*Pisum sativum* L.), espárragos (*Asparagus officinalis* L.), cilantro (*Coriandrum sativum* L.), pastos y malezas (Bellotti *et al*., 1999; Bellotti y García, 1983; Lacerda, 1983; Herrera, 1988).

Posee siete estados de desarrollo de huevo a adulto, pasando por cinco instares ninfales que se diferencian del adulto por ser el único volador; todos éstos se desarrollan en el suelo, incluyendo la etapa de cópula y oviposición. La repentina aparición de estos adultos en nuevas localidades sugiere una alta movilidad con sus vuelos nocturnos (Gold *et al*., 1988). La especie *C. bergi* se alimenta al introducir su fuerte estilete a través de la epidermis de las raíces, tubérculos y frutos subterráneos, dejando lesiones que facilitan la introducción de patógenos del suelo como *Aspergillus*, *Genicularia*, *Phytophthora*, *Diplodia*, *Phytium* y *Fusarium* (CIAT, 1980).

La distribución geográfica del chinche está limitada a los geotrópicos, en donde tiene su origen; los cambios en la abundancia de plantas hospederas locales y su distribución podrían influenciar la diversidad local de estos fitófagos (Strong *et al*., 1984). Así, por ejemplo, el incremento de monocultivos de yuca durante la pasada década (Coock, 1982) podría ser la causa de la aparición de esta plaga a principio de la década del 80, época en la que se reportó por primera vez en este cultivo; a partir de entonces se ha incrementado, convirtiéndose en un grave problema en muchas regiones a de Latinoamérica (García y Bellotti, 1980; Arias y Bellotti, 1985), siendo reportado en Colombia (CIAT, 1980), Venezuela (Clavijo, 1981), Costa Rica (Carballo y Saunders, 1990a), Panamá (Aguilar *et al*., 1989), Brasil y Cuba (Riis, 1990).
El control de *C. bergi* es difícil por su comportamiento polífago y el

ambiente críptico en el que habita, dificultando su manejo por el alto costo de la aplicación de pesticidas por las aplicaciones frecuentes, el riesgo ambiental al verse afectadas las poblaciones de organismos benéficos presentes en los suelos y, a su vez, la poca efectividad de aquellos (Bellotti *et al*., 1999). La mayor efectividad es la aplicación directa al suelo, pero esto implica una mayor contaminación de suelos, agua y fauna (Carballo y Saunders, 1990b), por lo que el uso de microorganismos entomopatógenos es la alternativa más conveniente. En Colombia, en los últimos 13 años se han realizado investigaciones con especies nativas y foráneas de nematodos entomopatógenos (nep's); entre éstas se pueden destacar trabajos para el control del chinche con *Heterorhabditis bacteriophora* (Barberena y Bellotti, 1998) y *Steinernema carpocapsae* (Caicedo y Bellotti, 1994).

En investigaciones con entomonematodos sobre esta plaga rizófaga, con aislamientos nativos (*H. bacteriophora*) e introducidos (*S. carpocapsae*) a diferentes concentraciones, muestran mayor susceptibilidad del quinto estado ninfal y los adultos, presentándose, por ejemplo, porcentajes de parasitismo del 60% para adultos y 10 a 50% en ninfas, cuando se evaluó un aislamiento introducido. Otros resultados con cepas nativas muestran un promedio de parasitismo entre 65 y 100% para ninfas y de 85 a 100% para adultos. En otros estudios de invernadero se observaron parasitismos mayores al 50%, con dosis promedios de nematodos de 25.000/ml (Barberena, 1996; Caicedo y Bellotti, 1994; CIAT, 2003).

Materiales y métodos

Sitio de estudio

Este estudio se realizó en el laboratorio de Manejo Integrado de Plagas, en el CIAT, bajo condiciones controladas (23 °C y 70 ± 5%) y total oscuridad.

Cría de los insectos plaga

Para la realización de estos ensayos fue necesario tener crías masivas bajo condiciones controladas de laboratorio de los insectos: polilla mayor *Galleria mellonella* y chinche subterráneo. Con *C. bergi* se usaron especimenes de los seis estados de desarrollo; y con *G. mellonella* larvas del último estado de desarrollo, necesarias para la multiplicación de los nematodos y los controles en laboratorio.

Cepas de nematodos

Las cepas utilizadas fueron: una introducida, *Heterorhabditis bacteriophora* cepa E-Nema®, y una nativa, *Steinernema feltiae*, cepa Colombia. Se usó la concentración de 10.000 nematodos infectivos/ml. La multiplicación de nematodos se realizó *in vivo* sobre larvas de *G. mellonella*. Las cepas se mantuvieron en agua destilada estéril, dentro de una incubadora, a total oscuridad y a 15 ºC.

Unidad experimental

Se utilizaron vasos plásticos transparentes con tapa, con capacidad de 56 ml. A cada vaso se le agregó 20 g de arena estéril hidratada al 3%, un individuo de la plaga y un grano de maíz pregerminado (4 a 5 días) para su alimentación. A cada unidad se le aplicó 1 ml de la suspensión de nematodos y 1ml de agua destilada estéril (ADE). Para los controles se utilizó sólo ADE. Estas unidades se mantuvieron en condiciones de total oscuridad, dentro de bolsas plásticas negras para dar un efecto invernadero y evitar la deshidratación. El alimento se cambió cada ocho días y se evaluó 15 días después de la infección.

Variables evaluadas

Porcentaje de infección de nematodos. Para esta determinación se consideraron tanto los individuos vivos como los muertos de todos los estados del chinche, los cuales se disectaron bajo el estereoscopio para establecer la presencia de nematodos en su interior, y determinar así el número de individuos infectados por entomonematodos en cada

tratamiento.

Porcentaje de mortalidad del chinche *C. bergi*. Se determinó disectando los individuos muertos, para establecer la presencia de nematodos en el interior y verificar que la muerte fue causada por estos patógenos.

Diseño experimental

El experimento se implantó en un diseño experimental completamente al azar (DCA), considerando dos factores en estudio que fueron: los seis estados de desarrollo del chinche y dos cepas de nematodos entomoparásitos, con un testigo absoluto sin ninguna aplicación y un testigo atípico de *G. mellonella* en arena, en cajas de Petri para control de infectividad de las cepas.

Se trabajó con 10 individuos por tratamiento, con cuatro repeticiones, mientras que para los controles de *G. mellonella* se utilizaron 20 larvas por cepa.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza ANAVA para establecer diferencias estadísticas en cada variable del estudio. Posteriormente, a las variables con diferencias estadísticas se les realizó una prueba de significación (Duncan P = 0.05) a fin de establecer los rangos significativos. Para el efecto se usó el paquete estadístico Infostat (2006). Debido a la presencia de ceros y valores pequeños, fue necesario transformar los datos con la fórmula $\sqrt{x+1}$.

En las gráficas se presentaron los datos originales en porcentajes, usando para esto el software MS Excel. Finalmente, para observar la tendencia del efecto de los tratamientos en los dos experimentos se hicieron regresiones.

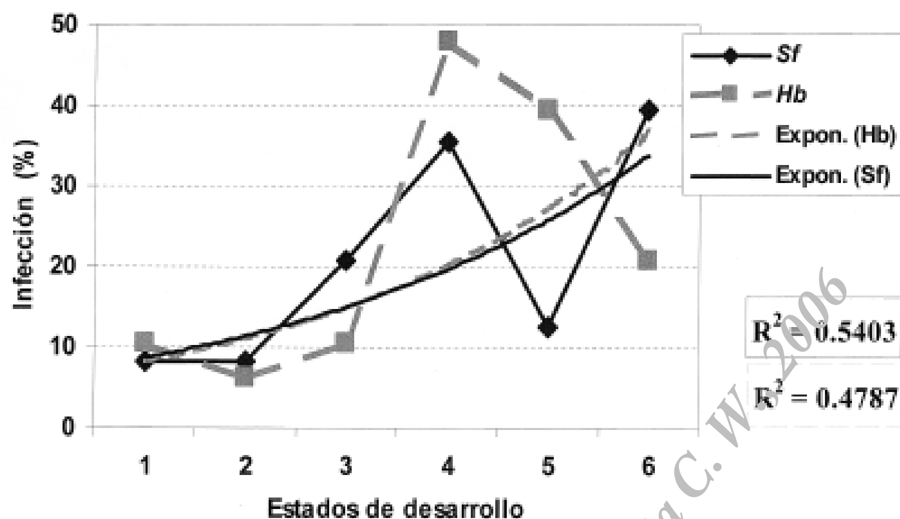


Figura 1. Regresión de la variable infección de los seis estados de desarrollo de *C. bergi* con dos cepas de nep's [(*Sf: Steinernema feltiae* (cepa Colombia)*; Hb: Heterorhabditis bacteriophora* (E-nema)]. Estados de desarrollo: 1 = primero; 2 = segundo; 3 = tercero; 4 = cuarto; 5 = quinto; 6 = adulto.

Resultados

Porcentaje de infectividad sobre los seis estados de desarrollo

No se observaron diferencias significativas para las cepas, pero sí para los estados de desarrollo. En éstos se observó una tendencia de mayor infectividad para el cuarto instar (48,4%), seguida por los estados adulto (46,9%) y quinto (41%), frente al primero (33,4%) y el segundo instar (31,8%).

Además de realizar un análisis de regresión, se observó que a mayor edad del chinche la probabilidad de infección aumentó (figura 1).

Porcentaje de mortalidad de la plaga

Al igual que para la infección, no hubo diferencias para mortalidad entre cepas, pero sí entre estados; de éstos los más susceptibles fueron

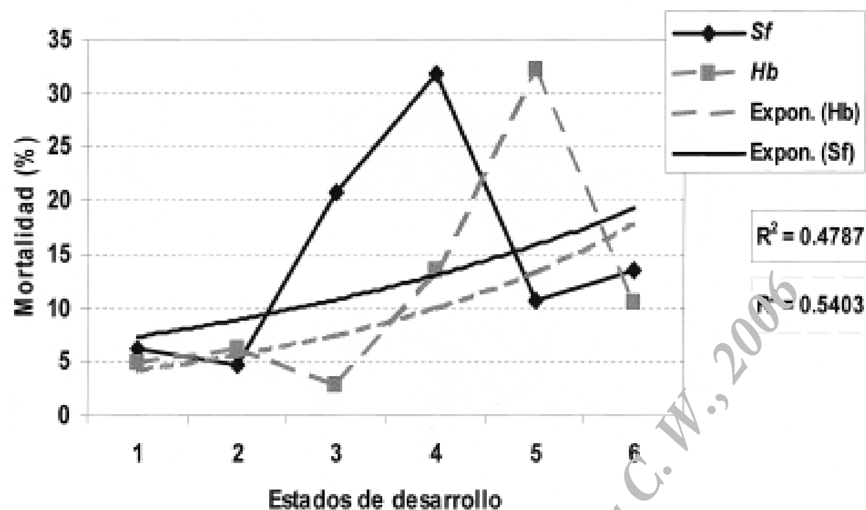


Figura 2. Regresión de la variable mortalidad de los seis estados de desarrollo de *C. bergi* con dos cepas de nep's [(*Sf: Steinernema feltiae* (Cepa Colombia)*; Hb: Heterorhabditis bacteriophora* (E-nema)]. Estados de desarrollo: 1 = primero; 2 = segundo; 3 = tercero; 4 = cuarto; 5 = quinto; 6 = adulto.

el cuarto y quinto. Al realizar un analisis de la regresión, la tendencia fue la misma que en la variable anterior: a mayor edad mayor mortalidad (figura 2). Estos resultados corroboran lo encontrado por Caicedo y Bellotti (1994) y Barberena (1996), en donde siempre los estados más avanzados fueron los más susceptibles a otras cepas de nep's nativas (*H. bacteriophora*) e introducidas (*S. carpocapsae*).

Queda todavía mucho por investigar con esta plaga y la posibilidad de manejo con estos entomoparásitos, considerando los resultados obtenidos en este estudio y en preliminares, donde han mostrado las posibilidades de estos agentes de control.

Conclusiones

No hubo diferencias en infección y mortalidad entre las cepas nativa (*S. feltiae*) e introducida (*H. bacteriophora*), con todos los estados de desarrollo de la plaga, pero sí entre éstos; los más susceptibles a la

infección fueron el cuarto, quinto y adulto, siendo el cuarto y quinto estado los más susceptibles y produciendo mayor mortalidad.

Referencias

AGUILAR, J.A.; GONZÁLEZ, A.; LÓPEZ, J.; CONCEPCIÓN, J.; GORDÓN, R. 1991. Evaluación y control de daño ocasionado por el chinche subterráneo *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae) en el cultivo de la yuca var. Brasileña. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP). 127 p.

BARBERENA, M.F. 1996. Capacidad parasítica de dos razas del nematodo *Heterorabditis bacteriofora* Poinar (Rhabditida: Heterorhabditidae) sobre el chinche de la viruela de la yuca *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera:Cydnidae) en condiciones de laboratorio. Trabajo de grado para Bióloga. Universidad del Valle. Facultad de Ciencias. Depto. de Biología. Santiago de Cali. 89 p.

BELLOTTI, A.C.; GARCÍA, C.A. 1983. The subterranean Chinch Bug, a new pest of cassava. Cassava Newsletter 7: 10-11.

BELLOTTI, A.C.; SMITH, L.; LAPOINTE, S.L. 1999. Recent advances in cassava pest management. Annual Review Entomology 44: 343-70.

CAICEDO, A.M.; BELLOTTI, A.C. 1994. Evaluación del potencial del nematodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae* Weiser (Rhabditida: Steinernematidae) para el control de *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae) en condiciones del laboratorio. Revista Colombiana de Entomología 20(4): 241-246.

CARBALLO, M.; SAUNDERS, J.L. 1990a. Labranza del suelo e insecticidas: efecto sobre la incidencia de *Cyrtomenus berg*i Froeschner en maíz. Turrialba 40: 165-168.

CARBALLO, M.; SAUNDERS, J.L. 1990b. Manejo del suelo, rastrojo y plagas: interacciones y efecto sobre el maíz. Turrialba 40: 183-189.

CIAT. 1980. Cassava Program Annual Report. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

CIAT. 2003. Cassava Entomology. p. 1-42. En: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Annual Report. Integrated Pest and Disease Management in Major Agroecosystems. Cali, Colombia. 258 p.

CLAVIJO, S. 1981. Variaciones estacionales de poblaciones de adultos de *Spodoptera frujiperda* y *Cyrtomenus bergi* en cinco localidades de los alrededores del lago Valencia,

medidas mediante trampas de luz. Revista Facultad de Agronomía (Maracay) 12: 63-79.

COOCK, J.H. 1982. Cassava: A basic energy source in the tropics. Science 218: 755-762.

GARCÍA, C.A.; BELLOTTI, A.C. 1980. Estudio preliminar de la biología y morfología de *Cyrtomenus bergi*, Froeschner, nueva plaga de la yuca. Revista Colombiana de Entomología 6:3-4: 55-61.

GOLD, C.S.; VARGAS, O.; WIGNIMAN, J. 1988. Intercropping effects on insect pest of cassava in Colombia and of groundnut in India. CP479. International Crop Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), Patancheru. Andhra Pradesh. India. Pp. 1-18.

HERRERA, M.G. 1988. Reconocimiento y manejo de la chinche subterránea *Cyrtomenus bergi* Froeschner., en cultivos de "cebolla de rama" en Pereira. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) Pereira. Colombia. 27 p.

INFOSTAT. 2006. Manual del usuario. Grupo INFOSTAT, FCA., Universidad Nacional de Córdoba. 1 ed. Editorial Brujas Argentina. 318 p.

LACERDA, J.I. 1983. Dano causados ao dendê (*Elais guineensis*) por ação do *Cyrtomenus bergi* (Froeschner, 1960) (Hemiptera: Cydnidae). Revista Floresta (Brazil) 14: 59-60.

RIIS, L. 1990. The subterranean Burrower Bug *Cyrtomenus bergi* Froeschner, and increasing pest in Tropical Latin America: Behavioural Studies, population fluctuations, Botanical Control, with special reference to cassava. Tesis M.Sc. Institute of Ecology and Molecular Biology, Section of Zoology, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen-Denmark. 88 p.

STRONG, D.R.; LAWTON, S.R.; SOUTHWOOD, S.R. 1984. Insects on plants. Community patterns and mechanisms. Blakcwell Scientific Publications.

Evaluación de concentraciones de *Heterorhabditis bacteriophora* (Italia) sobre larvas de segundo instar de *Phyllophaga menetriesi* (Coleoptera: Melolonthidae)

Elsa Liliana Melo M.[*], Carlos Alberto Ortega O.[**],
Andreas Gaigl[**], Anthony C. Bellotti[**]

Resumen

La patogenicidad del aislamiento italiano del nematodo entomoparásito *Heterrhabditis bacteriophora* fue evaluada frente al estado II de la chisa *Phyllophaga* pos. *bicolor*, bajo condiciones de laboratorio. Diferentes concentraciones fueron probadas, comportándose de igual manera las concentraciones más bajas (32 y 100 IJs/larva) frente a las más altas (307, 960, 2.000 y 3.000 IJs/larva), las cuales fueron iguales entre sí, presentando un promedio de mortalidad del 96%, resultados muy promisorios considerando datos obtenidos previamente con otros aislamientos. Considerando las dificultades de la introducción de nematodos, es importante la evaluación de aislamientos o especies nativas para el control de esta plaga.

Introducción

Las larvas de los escarabajos Melolonthidae (Coleoptera) son de las mayores plagas rizófagas en los cultivos de yuca, espárragos y pasturas de diversas zonas de Colombia, causando serias pérdidas económicas.

---

[*] Autor para correspondencia: Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT. A.A. 6713, Cali. Tel.: 445 00 00, fax.: 445 00 73, E-mail: elmelo@hotmail.com

[**] Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT.

En yuca, el daño se caracteriza por la destrucción de la corteza de las estacas sembradas, las cuales pueden podrirse y morir, y el ataque a las plantas jóvenes (1-3 meses) ocasiona el marchitamiento de éstas (Bellotti *et al*., 1983), el método de control más frecuente es el químico, el cual no ha dado resultados satisfactorios a los agricultores.

Dentro de las especies más importantes se encuentra *Phyllophaga menetriesi*, por lo que se la ha considerado como candidata para control biológico por medio de nematodos entomoparásitos o entomopatógenos (Klein, 1990).

En los últimos 50 años, diferentes tipos de nematodos que atacan insectos han sido examinados como un potencial para el control biológico de plagas (Federico, 2002).

En Colombia, la búsqueda de entomo-parásitos para el control de esta plaga está bastante documentada, aunque en mucha menor proporción comparada con la trayectoria internacional (Amaya y Bustamante, 1975; Londoño, 1993; Londoño y Pérez, 1994; Sánchez y Vásquez, 1996; Sáenz y Luque, 1999; Ramírez, 2002); manteniéndose el interés en estos agentes controladores, por sus características y sus hábitos similares a la plaga blanco.

Los más recientes estudios realizados muestran que el estado de desarrollo de la plaga influencia el efecto biocontrolador de los nematodos, además de la especificidad de ciertas cepas a determinadas plagas (Melo *et al.,* 2005).

Lo anterior motiva el planteamiento de este estudio en la búsqueda de la mejor concentración de una especie introducida del nematodo entomoparásito (nep) *Heterorhabditis bacteriophora,* cepa Italia, para el control de la larva 2 de *P. menetriesi*, en condiciones de laboratorio.

Metodología

Este experimento se llevó a cabo en laboratorio, bajo condiciones controladas (23 +/- 2 °C, 70 +/-5%) y en total oscuridad.

Insecto blanco

Se trabajó con chisas en estado larval 2, obtenidas de la cría en laboratorio, las que se mantuvieron en vasos plásticos transparentes con capacidad volumétrica de 150 ml, con tapa. Las chisas se alimentaron con plántulas de arroz de 20 días de germinación, en suelo orgánico formado por tierra capote:suelo (Santander de Quilichao) en la proporción 1:1.

Nematodo biocontrolador

Se utilizó la cepa italiana de *H. bacteriophora,* que resultó muy patogénica en ensayos previos (CIAT, 2004). Las concentraciones empleadas fueron 0, 32, 100, 307, 960, 2.000 y 3.000 IJs/larva de chisa; valores que provinieron de una organización logarítmica (log10), a fin de obtener una proporción incrementada de la concentración de nematodos. La aplicación de estas concentraciones se hicieron un día después de depositar la chisa y el arroz en los vasos; al testigo (concentración 0) se le aplicó únicamente agua destilada estéril.

La evaluación se realizó 20 días después de la inoculación y para el efecto se contabilizaron las larvas muertas, dejándolas en cámara de maduración (trampa White modificada) para la verificación y recuperación de los nematodos.

Diseño experimental

El experimento se implantó en un diseño experimental completamente al azar (DCA), en arreglo unifactorial que corresponde a las seis

concentraciones de nematodos entomoparásitos, con cuatro repeticiones. La unidad experimental estuvo conformada por 13 vasos plásticos con larvas individualizadas.

Los datos se transformaron con la fórmula de Abbott (1925), luego se realizó un ANAVA y la prueba de Tukey para determinar la separación de medias (P = 0,05). Se verificó la normalidad con la prueba de Shapiro y Wilks con los residuos (Infostat, 2006).

Resultados y discusión

Los datos no muestran una respuesta clara de la dosis en cuanto a la mortalidad para las concentraciones de 32 y 100 IJs, ya que éstas no difieren significativamente del control, sin embargo, las concentraciones de 307 a 3.000 IJs causaron entre ellas el mismo alto nivel de mortalidad (87 - 95%) ($F = 70,53$; gl = 5; $P = 0,0001$). Con estos datos se muestra la diferencia de la susceptibilidad de *H. bacteriophora* sobre la L2, siendo más susceptible, en comparación con la L3, que es más

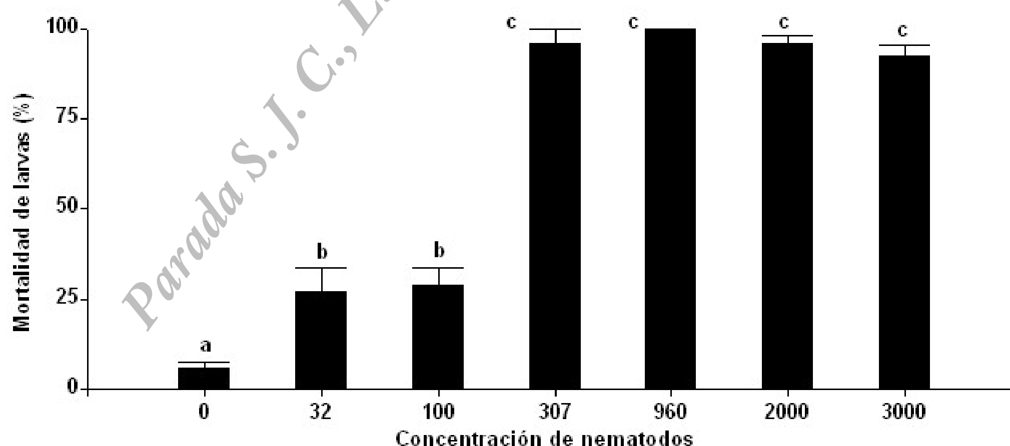


Figura 1. Mortalidad de larvas de segundo ínstar de *Phyllophaga menetriesi* infectadas con la cepa de nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* (Italia) aplicada en diferentes concentraciones. Letras diferentes indican diferencias significativas (P = 0,05).

resistente. Del mismo modo, al aplicar 10.000 IJs de *H. bacteriophora* por larva se obtuvieron porcentajes de mortalidades de 12 y 35% sobre la larva 3 joven y madura, respectivamente (Melo *et al*., 2005). Esta especie de chisa ha presentado una marcada resistencia a las cepas de entomonematodos (Koppenhofer y Fuzy, 2003; Simard *et al*., 2001; Melo *et al.,* 2004); resistencia que es un limitante para el uso de estos microorganismos como control biológico (Cappaert y Koppenhofer, 2003). Sin embargo, algunos experimentos previos muestran resultados promisorios con otras cepas de nep's para el segundo instar de *Anomala orientalis* con *Heterorhabditis* sp., *S. carpocapsae*, *S. glaseri*, y *S. longicaudum* (Lee *et al.,* 2002); lo anterior es muy importante en la medida que muestran la posibilidad de control en este estado larval 2 (Melo *et al.,* 2005).

En ese sentido, se debe considerar la evaluación de cepas nativas promisorias, así como las mejores dosis, viables comercialmente. Como se ve en estos resultados, además de conocer la dinámica de la población en áreas problema, se puede evaluar la época apropiada para hacer las aplicaciones, considerando que en regiones del Cauca la larva 2 se hace presente en los meses de noviembre y diciembre; además, se podría evaluar el uso conjunto con otros microorganismos u otras prácticas culturales considerables dentro de un programa MIP.

Koppenhofer y Fuzy (2004) plantean que hay efecto de los nematodos de diferente manera de acuerdo con el estado de desarrollo; pero este efecto es dependiente de la especie de chisa y la cepa de nematodo empleada.

Basado en nuestras observaciones sobre la susceptibilidad de *P. menetriesi* a los nematodos aplicados, están acordes con los recomendados para las chisas de 2,5 - 5,0 billones IJs/ha, que podrían ser factibles comercialmente (CIAT, 2004); queda verificar si los resultados pueden ser replicados bajos las condiciones de campo.

La concentración, 307 IJs/ml, produjo 91% de mortalidad, no presentando diferencias con las concentraciones más altas evaluadas, por lo que se la considera con mucha factibilidad comercial.

La cepa de *Heterorhabditis* utilizada es introducida y, a pesar de presentar resultados promisorios, es conveniente seguir evaluando cepas nativas que muestren mayor patogenicidad.
Quedan muchos aspectos por evaluar para responder a la inquietud de los agricultores de cómo y cuándo controlar esta plaga, siendo este trabajo un comienzo, pues no se conocen estudios previos sobre la evaluación de estos entomoparásitos frente a *P. menetriesi*.

Referencias

ABBOTT, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18:265–267.

AMAYA, L.M.; BUSTAMANTE, E. 1975. Control biológico de tres especies de coleópteros plagas del suelo en Colombia. Publicación Científica del Instituto Colombiano Agropecuario ICA. 10(3): 269-282.

BELLOTTI, A.C.; REYES, J.A.; ARIAS, B.A.; VARGAS, O. 1983. Insectos y ácaros de la yuca y su control. p. 69-93. En: Reyes, J. A. (Ed.). Yuca: Control Integrado de Plagas. PNUD y Centro Internacional de Agricultura Tropical. 362 p.

CAPPAERT, D.; KOPPENHOFER, A.M. 2003. *Steinernema sacarabaei,* an entomopathogenic nematodo for control of the European chafer. Biological Control 28: 379-386.

CIAT. 2004. Soil pests-Cassava and other crops. p. 116-165. En: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Annual Report. Integrated Pest and Disease Management in Major Agroecosystems. Cali, Colombia. 417 p.

FEDERICI, B.A. 2002. A perspective on Pathogens as Biological Control Agents for Insect Pests. En: Diagnosis Plant Diseases caused by Nematodes. Pp. 539-544.

INFOSTAT. 2006. Manual del usuario. Grupo INFOSTAT, FCA., Universidad Nacional de Córdoba. 1 ed. Editorial Brujas Argentina. 318 p.

KLEIN, M. 1990. Efficacy against soil-inhabiting insect pests. In: "Entomopathogenic nematodes in biological control" (R. Gaugler and H.K. Kaya, Eds.). CRC Press. Boca Raton, FL. Pp. 195-214.

KOPPENHÖFER, A.M.; FUZY, E.M. 2003. *Steinernema sacarabaei* for the control of white grubs. Biological Control 28: 47-59.

KOPPENHÖFER, A.M.; FUZY, E.M. 2004. Effect of white grub developmental stage on susceptibility to entomopathogenic nematodes. Journal of Economic Entomology. 97(6): 1842-1849.

LEE, D.W.; CHOO, H.Y.; KAYA, H.K.; LEE, S.M.; SMITLEY, D.R.; SHIN, H.K.; PARK, C.G. 2002. Laboratory and field evaluation of Korean entomopathogenic nematods isolates against the oriental beetle *Exomala orientalis* (Coleoptera: Scarabaeidae). Journal Economic Entomology 95: 918-926.

LONDOÑO, M.E.; PÉREZ, M. 1994. Reconocimiento de los enemigos naturales de la chisa o mojojoy (Coleoptera: Scarabaeidae) en el oriente antioqueño. Revista Colombiana de Entomología 20(3): 199-206.

LONDOÑO, Z.M.E. 1993. Posibilidades del control biológico en el manejo de la chiza (Col: Scarabaeidae) para el departamento de Antioquia. Miscelánea Sociedad Colombiana de Entomología. Comité Seccional de Antioquia 28: 85-100.

MELO, E.L.; ORTEGA, C.A.; GAIGL, A.; BELLOTTI, A.C.; EHLERS, R-U. 2004. Diferencias en infección y supervivencia de tres especies de chisas litófagas, *Phyllophaga menetriesi, Phyllophaga* sp. y *Anomala* sp. (Coleoptera: Melolonthidae) con cinco cepas de entomonematodos. Resúmenes, XXXI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. Bogotá. 97 p.

MELO, E.L.; ORTEGA, C.A.; GAIGL, A.; BELLOTTI, A.C., 2005. Efecto del estado de desarrollo de *Phyllophaga menetriesi* y *Anomala inconstans* (Coleoptera: Melolonthidae) con dos cepas de entomonematodos. En: Resumen. XXXII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. Ibagué. 80 p.

RAMÍREZ, L.A. 2002. Efecto de varios entomopatógenos sobre *Phyllophaga menetriesi* Blanchard (Coleoptera: Melolonthidae), plaga de importancia económica para el Departamento del Cauca. Tesis de pregrado, Medellín-Colombia: Universidad Nacional de Colombia. 56 p.

SÁENZ, A.; LUQUE, J.E. 1999. Cuantificación invasiva de *Steinernema feltiae* cepa Villapinzón en *Tecia solanivora* y *Clavipalpus ursinus.* En: Resúmenes XXVI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. Bogotá. Pp. 28-30.

SÁNCHEZ, G.; VÁSQUEZ, N.M. 1996. Manejo de plagas en el sistema de producción de arracacha en el Departamento del Tolima. Ibagué, ICA. Boletín Técnico. 43 p.

SIMARD, I.; BÉLAIR, G.; BRODEUR, J. 2001. Susceptibility of the European chafer (Coleoptera: Scarabaeidae) to entomopathogenic nematodos (Rhabditidae: Steinernematidae, Heterorhabditidae). Suppl. Journal of Nematology 33: 297-301.

Índice de Organismos